



Universidad Complutense de Madrid
Master en Ciencias Odontológicas

Formación de biofilms
bacterianos sobre distintas
superficies de implantes
dentales

Eva Fernández Vidal
Tutor: David Herrera González
Junio 2013

Índice

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
3. Objetivos e Hipótesis	12
4. Material y método.....	14
4.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	14
4.2 Superficies seleccionadas.....	14
4.3 Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas	15
4.4 Formación del biofilm en las superficies seleccionadas	19
4.5 Obtención de mapas topográficos del crecimiento del biofilm y valoración de su evolución en el tiempo.....	22
4.5.1 Microscopía Laser Confocal (CLSM).....	22
4.5.2 Microscopía Electrónica de Barrido a Baja Temperatura (LTSEM) ..	24
4.6 Análisis cualitativo y cuantitativo de las especies bacterianas que forman parte del biofilm generado en contacto con la superficie del implante.....	25
4.6.1 Aplicación de la técnica de PCR cualitativa específica para cada bacteria.....	26
4.6.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	28
4.7 Análisis estadístico.....	31
5. Resultados.....	32
5.1 Análisis estructural y evaluación de la viabilidad de los biofilms por CLSM y LTSEM.....	32
5.2 Análisis cualitativo de los biofilms mediante PCR.....	40
5.3 Análisis cuantitativo de los biofilms mediante qPCR.....	44
6. Discusión	51
7. Conclusión.....	57
8. Agradecimientos.....	59
9. Bibliografía.....	60

1. Resumen

Antecedentes y objetivos: El biofilm bacteriano oral es uno de los factores más importantes en la patogénesis de las enfermedades periimplantarias, como mucositis o periimplantitis. Hoy en día, se sabe muy poco sobre el comportamiento de estas comunidades bacterianas periimplantarias y no hay pruebas suficientes para establecer conclusiones definitivas sobre la prevención y la eliminación de ellas. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un modelo de biofilm peri-implantario, formado por seis especies bacterianas, sobre distintos materiales de implantes, utilizando un sistema *in vitro* técnicamente simple de preparar, mantener y analizar.

Material y método: Se emplearon seis cepas de referencia estándar para desarrollar biofilms sobre discos de hidroxiapatita de 7 mm de diámetro y 1,8 mm de ancho, discos de titanio grado 2, superficie SLA de 5 mm de diámetro y discos de ZrO_2 de 5 mm de diámetro. Se introdujeron tres discos de cada material en placas estériles de cultivo celular de 24 pocillos. Las especies seleccionadas representan colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). La estructura de los biofilms obtenidos se estudió usando microscopía láser confocal (CLSM) y microscopía electrónica de barrido a baja temperatura (LTSEM). La cinética del biofilm bacteriano y el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/biofilm de cada especie se obtuvieron mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), además se realizó un análisis cualitativo de los biofilms mediante PCR convencional. El análisis estadístico se realizó con el análisis de la varianza (ANOVA).

Resultados: El presente estudio no ha encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el número de bacterias que participan en el desarrollo del biofilm maduro *in vitro* sobre titanio y zirconio, sin embargo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la estructura de los biofilms, observados por CLSM y LTSEM. Además, se observó que la formación de biofilms *in vitro* en las superficies de implantes utilizados se produjo de una manera similar a como se producen en los dientes, representados por el material de hidroxiapatita.

Conclusiones: Este estudio demuestra que el modelo de biofilm *in vitro* propuesto es válido para el desarrollo de biofilms periimplantarios y permite evaluar, no sólo el recuento bacteriano, sino también el efecto de la superficie del implante en el desarrollo de los biofilms.

2. Introducción

La gran mayoría de los microorganismos en la naturaleza se encuentran adheridos a superficies donde crecen formando biopelículas o biofilms (Marsh 2005); de hecho, los biofilms constituyen el estado más habitual de las bacterias en la mayoría de los ecosistemas naturales (Stoodley et al. 2002). Una definición ampliamente aceptada de un biofilm bacteriano, postulada por Donlan y Costerton (2002), lo describe como «una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes».

Las bacterias en la boca se asocian formando biofilms. La placa dental es un ejemplo de biopelícula formada por combinaciones de cientos de especies bacterianas que compiten para colonizar las superficies de la cavidad oral (Sedlacek y Walker 2007). La capacidad de unirse entre sí y adherirse a superficies es una estrategia fundamental de supervivencia para la mayoría de los organismos procariotas (Marsh 2005).

La asociación de las bacterias en las biopelículas orales no es aleatoria sino que hay asociaciones específicas entre especies bacterianas. Socransky et al examinaron más de 13.000 muestras de placa subgingival procedente de 185 adultos e identificaron seis grupos de especies bacterianas asociadas, que incluían colonizadores iniciales, como *Streptococcus oralis* con capacidad para fijarse a diferentes receptores de la película dental y proveer de receptores a

especies como *Fusobacterium nucleatum*, intermedios y tardíos (Socransky et al. 1998) (Figura 1).

El biofilm oral, por lo tanto, se desarrolla por un proceso de colonización selectiva, reproducible y secuencial (Aas 2005, Díaz 2006, Kolenbrander 1990). En los colonizadores iniciales predominan especies de *Actinomyces*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Streptococcus* y *Veillonella* (Díaz 2006, Nyvad y Kilian 1987). Los colonizadores secundarios como las fusobacterias coagregan con los colonizadores iniciales y harán de puente para la coagregación de nuevas bacterias, destacando (por su potencial patógeno) las especies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (Kolenbrander 1993, 2002).



Figura.1 Esquema de la asociación entre especies subgingivales tomado de Socransky et al. 1998.

Los datos provienen de 13.261 muestras de placa subgingival tomadas de 185 adultos. Los complejos de la izquierda están compuestos por especies que se cree que colonizan la superficie dentaria y proliferan en estadios tempranos. El complejo naranja se cree que es el puente entre los colonizadores iniciales y las especies del complejo rojo que dominan en etapas tardías. (Socransky et al. 1998).

Los biofilms orales están considerados como los agentes etiológicos de las enfermedades bucales más importantes. Las enfermedades bucales relacionadas con los biofilms microbianos son las más prevalentes del ser humano y afectan a la mayor parte de la población mundial (Sheiham y Netuveli 2002). Entre ellas destacan las enfermedades periodontales (gingivitis

y periodontitis) y la caries dental, causadas por bacterias organizadas en forma de biofilms sobre las superficies dentarias.

Recientemente, además de con las enfermedades periodontales y periimplantarias, los biofilms bacterianos se han asociado con patologías sistémicas, como enfermedades cardiovasculares, descompensación de diabetes o parto prematuro. En las últimas décadas se ha introducido el uso de implantes osteointegrados como soporte para prótesis fijas o removibles (Berglundh et al. 2002), pero éstos no están libres de problemas a medio y largo plazo, entre ellos la progresión de las enfermedades periimplantarias, en las que se cree que el biofilm oral juega un papel fundamental (Lang y Berglundh 2011).

Dentro de las enfermedades periimplantarias se diferencian: la mucositis periimplantaria, que consiste en una inflamación en la mucosa sin pérdida de hueso de soporte y la periimplantitis en la que, además de inflamación, hay pérdida de soporte óseo. (Zitzmann y Berglundh 2008). Tanto en la Revisión sistemática de Zitzmann y Berglundh (2008), como en el Informe del Sexto Taller Europeo de Periodoncia de Lindhe y Meyle (2008), indican que la prevalencia de estas infecciones es similar a las de las enfermedades periodontales, presentando mucositis periimplantaria en el 80% de los pacientes portadores de implantes dentales y al 50% de dichos implantes y periimplantitis entre el 28 y el 56% de los sujetos y entre el 12% y el 43% de los implantes (Zitzmann y Berglundh 2008, Lindhe y Meyle 2008).

Se postula que las enfermedades periimplantarias tienen origen infeccioso y naturaleza inflamatoria y están causadas por bacterias presentes en los

biofilms orales, tanto sobre las superficies de los implantes como en los tejidos blandos periimplantarios (Lang y Berglundh 2011). La relación entre la acumulación de placa y la pérdida progresiva de hueso alrededor de los implantes ha sido demostrada en numerosos estudios; la acumulación de placa en la superficie de los implantes y los pilares induce una reacción inflamatoria en la encía y mucosa alveolar (Scarano et al. 2004, Yoshinari et al. 2001).

Poco se conoce sobre los mecanismos de las interacciones bacterianas con los implantes dentales en la cavidad oral. Los primeros estudios sobre la periimplantitis apuntaban una similitud entre la microbiota de las enfermedades periimplantarias y las enfermedades periodontales, pero con el tiempo, estudios posteriores apuntaron la posibilidad de que un número limitado de casos pueda albergar una microbiota diferente, más parecida a la de otras infecciones asociadas con sistemas médicos implantados. Aunque no hay evidencia de la existencia de un número limitado de patógenos específicos para la periimplantitis, algunos estudios han indicado que las infecciones periimplantarias en ocasiones pueden estar relacionadas con una microflora con un perfil diferente al de la enfermedad periodontal (Mombelli y Décaillot 2011). Esto está en desacuerdo con numerosos estudios que compararon, en animales, los cambios histológicos y microbiológicos alrededor de la encía en dientes e implantes, simulando gingivitis y mucositis periimplantaria respectivamente (Berglundh et al. 1992, Leonhardt et al. 1992, Ericsson et al. 1992). Estos estudios demostraron, no sólo que la composición bacteriana de dichos biofilms era similar, si no que la reacción inflamatoria de los tejidos blandos era parecida, aunque en los tejidos periimplantarios la progresión del infiltrado inflamatorio fue más rápida.

Al Igual que en el periodonto sano alrededor de los dientes naturales, los microorganismos asociados con los implantes sanos son predominantemente cocos Gram positivos, miembros de los complejos amarillo y morado, o especies independientes como *Actinomyces*. Estas especies crean las condiciones previas para la adhesión de miembros del complejo naranja y de patógenos periodontales como los de los complejos rojo y verde formados por bacterias Gram negativas (Lee y Wang 2010, Quirynen et al. 2006, Socransky et al. 1998). La biopelícula asociada con los implantes es significativamente diferente de la de los implantes sanos (Quirynen et al. 2006, Kumar et al. 2012, Shibli et al. 2008). La principal diferencia entre un implante sano y otro enfermo parece estar en las proporciones de especies de *Actinomyces* y de los complejos rojo y verde (Kumar et al. 2012, Shibli et al. 2008, Tabanella et al. 2009).

Distintos factores pueden influir en la formación de los biofilms periimplantarios: la presencia de dientes naturales y su estado periodontal (Quirynen et al. 1996), la discrepancia o “gap” entre los distintos aditamentos de los implantes (Binon et al. 1992, Jansen et al. 1997), la higiene oral (Lindquist et al. 1988) y la superficie del implante, que favorezca o no la adhesión y formación de biofilms (Quirynen y Bollen 1995).

Las mismas características de las superficies de los implantes, como rugosidad, composición química o hidrofobicidad, que en los últimos años han evolucionado enormemente, han demostrado que pueden favorecer la colonización de bacterias procedentes del biofilm subgingival (Wennerberg y Albrektsson 2010).

El material más empleado para la fabricación de implantes dentales es el titanio, especialmente por su biocompatibilidad, capacidad de óseo-integración y sus propiedades mecánicas. Pero la rugosidad de la superficie favorece la adhesión y acumulación bacteriana (Wennerberg y Albrektsson 2010). Por este motivo se están elaborando materiales alternativos como la hidroxiapatita y el zirconio, que presentan propiedades físicas similares pero con mayor afinidad química al hueso y con mayor resistencia a la adherencia bacteriana (Wennerberg y Albrektsson 2010). Así, por ejemplo, investigaciones recientes en animales han demostrado que la capacidad de integración ósea del óxido de zirconio no parece ser diferente a la del titanio, es biocompatible y menos propenso al acúmulo de placa (Kohal et al. 2008).

Existen todavía pocos estudios que investiguen el efecto de la superficie de los implantes en el inicio de la periimplantitis. Los datos disponibles provienen de estudios experimentales que sugieren que las características superficiales pueden tener un efecto sobre la progresión de una periimplantitis ya establecida (Renvert et al. 2011).

El único modo de entender los sinergismos que ocurren en estas comunidades y tratar de prevenir sus efectos deletéreos, es estudiar las bacterias patogénicas de dichos biofilms, no como cepas individuales sino en comunidad, así como estudiando a fondo las interacciones bacterianas. Por ello es fundamental el desarrollo de modelos *in vitro* de comunidades microbianas organizadas con unas condiciones que reproduzcan el hábitat natural de estos biofilms, incluyendo las condiciones de superficie, así como las características específicas de accesibilidad de nutrientes, medio- ambiente físico- químico, etc.

Se han desarrollado algunos modelos de biofilm *in vitro* empleando diversas tecnologías con una o dos especies bacterianas y, con frecuencia, con evaluaciones a corto plazo (24 horas o menos), que no pueden describir la dinámica de maduración y la secuencia de eventos que ocurren en el desarrollo de un biofilm periimplantario en estado estacionario (Burgers et al. 2010, Lee et al. 2011, Afya et al. 2012, Rimondini et al. 2002). Sin embargo, no hay prácticamente modelos de biofilm *in vitro* validados donde se reproduzca la dinámica y la secuencia de colonización bacteriana del biofilm subgingival periimplantario, donde puedan ser comparados los procesos de formación y desarrollo de estos biofilms orales sobre diferentes superficies (Rimondini et al. 2002, Lee et al. 2011, Busscher et al. 2010, Lee y Wang 2010, Costerton et al. 2005).

3. Objetivos e Hipótesis

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un modelo de biofilm periimplantario, formado por seis especies bacterianas, sobre distintos materiales de implantes, utilizando un sistema *in vitro* técnicamente simple de preparar, mantener y analizar. La formación del biofilm con bacterias orales sobre las distintas superficies de implantes se ha realizado utilizando el modelo ya puesto a punto en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, sobre superficies de hidroxiapatita, un modelo *in vitro* de biofilm subgingival con el que estudiar de un modo reproducible la estructura y cinética de formación del mismo, a partir de seis de las principales bacterias implicadas en su desarrollo subgingival *in vivo*, representadas por colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*), y colonizadores tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) (Sánchez et al. 2011).

El propósito de este estudio fue comparar la formación del biofilm sobre la superficie de los implantes de Titanio y Zirconio, utilizando como referencia la Hidroxiapatita.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- Desarrollar biofilms con 6 especies bacterianas seleccionadas previamente, durante diferentes tiempos (12, 24, 48, 72 y 96 horas) de incubación en los tres materiales seleccionados.

- Estudiar la estructura espacial del biofilm generado en cada uno de los materiales y viabilidad de los microorganismos en el mismo.
- Verificar la presencia de las 6 especies bacterianas introducidas en el biofilm en cada caso.
- Cuantificar el total de las bacterias que conforman el biofilm generado en cada material de implante.

Se planteó la siguiente hipótesis:

La adhesión, formación y estructura de los biofilms de un conjunto de bacterias orales es dependiente de las superficies que colonicen.

4. Material y método

4.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

La formación de un biofilm con bacterias orales sobre distintas superficies de implantes se ha realizado seleccionando bacterias que representan a los colonizadores primarios, secundarios y tardíos: *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*. Las cepas utilizadas y las colecciones de cultivo tipo a la que pertenecen se muestran en la Tabla 1. Las cepas se mantienen crio- conservadas a -80°C.

Tabla 1.- Cepas seleccionadas en el estudio y colección de cultivo tipo

Cepa	Referencia
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSMZ ¹ 20482
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ 8324
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC ² 11810
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC ³ 19039
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT ⁴ 907T

¹DMS, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen

²NCTC, National Collection of Type Cultures

³ATCC, American Type Cultures Collection

⁴CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

Las bacterias se crecieron en placas de medio Agar Sangre (Oxoid no 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), suplementado con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L), en condiciones de anaeróbicas (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio) a 37°C entre 24- 72h.

4.2 Superficies seleccionadas

Se utilizaron tres superficies de crecimiento, discos de hidroxiapatita de 7 mm de diámetro y 1,8 mm de ancho (Estados Unidos, Productos Clarkson

Chromatography, Williamsport, PA, Estados Unidos), discos de titanio grado 2, superficie SLA de 5 mm de diámetro (Straumann; Instituto Straumann AG, Basel, Suiza) y discos de ZrO^2 de 5mm de diámetro (Straumann; Instituto Straumann AG, Basel, Suiza) (Figura 2).



Figura 2. De izquierda a derecha: Discos de Hidroxiapatita, Titanio y Zirconio empleados en el presente estudio.

4.3 Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas

Con el fin de estandarizar las condiciones del estudio e inocular una concentración constante de cada una de las cepas en todos los ensayos, favoreciendo así la reproducibilidad del modelo, se emplearon las curvas de crecimiento de cada bacteria, que fueron realizadas con anterioridad, para el desarrollo del modelo de biofilm estático (Sánchez et al. 2011). Estas curvas permitieron relacionar con facilidad los datos de densidad óptica (D.O), tiempo de generación y unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (UFC/mL).

Los ensayos se han realizado en 100 mL del medio denominado BHI2, que consiste en medio BHI [medio Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company; EE.UU.), suplementado con:

- Mucina (2,5 g/L)

- Extracto de levadura (1,0 g/L)
- Cisteína (0,1 g/L)
- Bicarbonato sódico (2,0 g/L)
- Hemina (5 mg/L), Menadiona (1 mg/L)
- 0,25% de ácido glutámico (v/v)]

Se preparó un preinóculo a partir de una colonia de un cultivo fresco en placas de medio Agar Sangre suplementado, que se inoculó en 15 mL de medio BHI2, incubándolo en anaerobiosis a 37°C, durante 24-72h en función de la especie bacteriana. Entre 100-300 µL del preinóculo se adicionó a 100 mL de medio BHI2 fresco, para comenzar la curva en la fase “lag” o de aclimatación (aproximadamente 0,05 de D.O).

A determinados intervalos de tiempo, en función de la especie bacteriana, se fueron realizando medidas de la D.O a 550 nm. Las medidas de la densidad óptica se realizaron en un espectofotómetro (Figura 3), previamente calibrado con dos cubetas de medio BHI2, para posteriormente introducir 1 mL de cada una de las bacterias en sus respectivas cubetas y medir su densidad óptica, siempre dejando uno de los controles en el equipo.

Igualmente, se fueron tomando alícuotas de 100 µL, que fueron diluidas de forma seriada en buffer PBS estéril (por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) y sembradas en placas de Agar Sangre suplementado, siempre por duplicado, por el método de siembra en superficie. Las placas inoculadas se incubaron en anaerobiosis a 37°C. Después de 4 a 7 días de incubación, se realizó el recuento de las UFC por placa, para determinar el número total de UFC/mL.



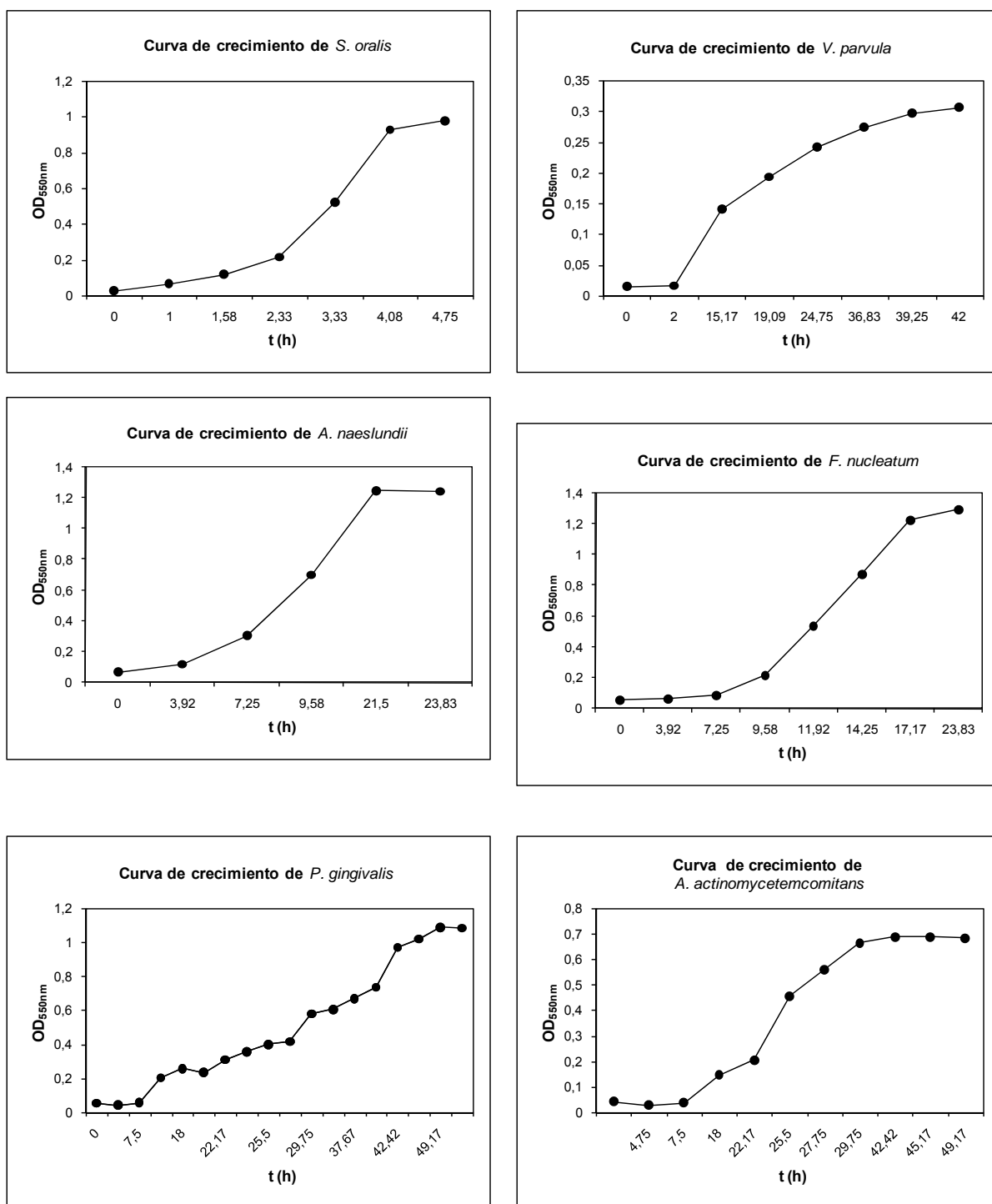
Figura 3. Espectrofotómetro.

Laboratorio de Microbiología de la
Facultad de Odontología de Univ.
Complutense de Madrid

De esta manera se relacionaron el tiempo de crecimiento, la medida de D.O. y las UFC/mL correspondientes.

Las curvas de crecimiento obtenidas en el estudio previo (Sánchez et al. 2011), y que han sido confirmadas en el presente trabajo, se muestran en la Figura 4.

Figura 4. Curvas de crecimiento de los microorganismos utilizados en el modelo (Sánchez et al. 2011).



4.4 Formación del biofilm en las superficies seleccionadas

Una vez conocidas las curvas de crecimiento, se procedió a la generación del biofilm sobre las diferentes superficies seleccionadas.

Una única colonia de cada aislado se inoculó en 15 mL de medio BHI2, que se incubó en anaerobiosis a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento en cada uno de ellos, que se comprobó con la medida espectrofotométrica de la D.O a 550nm. Se preparó un inóculo de 10 mL que contenga las 6 especies bacterianas seleccionadas (6mL de las especies bacterianas y 4mL de medio BHI2), a un valor de UFC/mL final previamente determinado, y que se mantuvo constante en todos los ensayos a fin de favorecer la reproducibilidad del modelo (Tabla 2).

Se ajustó la densidad óptica por dilución en el medio BHI2 fresco hasta los valores estipulados en el estudio. Estos valores vienen determinados por el tiempo de generación de cada bacteria, corroborado en las curvas de crecimiento (Figura 4).

Tabla 2.- Cepas seleccionadas en el estudio y concentración final (ufc/mL) en el preinóculo

Cepa	Concentración final (ufc/mL)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10^6
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10^6
<i>Veillonella parvula</i>	10^5
<i>Actinomyces naeslundii</i>	10^5
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10^6
<i>Streptococcus oralis</i>	10^3

Como ya se ha comentado, el biofilm se generó sobre un disco circular cuyo material corresponde a las diferentes superficies de implante consideradas en

el estudio (Hidroxiapatita, superficie SLA de Titanio obtenida por grabado ácido y superficie cerámica de Zirconia), siempre autoclavados durante 20 min a 121°C (Figura 5).



Figura 5. Discos y pinza autoclavados

Los discos se introdujeron en placas estériles de cultivo celular de 24 pocillos (Figura 6) (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania), tres discos de cada material, vertiendo en cada pocillo con disco 1500 µl del inóculo preparado (Figura 7). En dos pocillos vacíos se pusieron controles de medio BHI2 para confirmar la esterilidad del medio así como del proceso de manipulación e incubación.



Figura 6 Placa multipocillo estéril (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Alemania).

Durante todo el ensayo se trabajó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (Figura 8).



Figura 7 Pipeta vertiendo 1500 μ l del inóculo preparado sobre disco de Hidroxiapatita

El desarrollo del biofilm se llevó a cabo en anaerobiosis, a 37°C durante 12, 24, 48, 72, 96, horas. Transcurrido el tiempo estipulado de generación, los discos fueron retirados del sistema en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (Figura 8), para su posterior estudio.



Figura 8 Campana Flujo Laminar. Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología. Universidad Complutense de Madrid

4.5 Obtención de mapas topográficos del crecimiento del biofilm y valoración de su evolución en el tiempo

Se procedió a la obtención de mapas topográficos del crecimiento y maduración del biofilm sobre las diferentes superficies de implantes. Se estudiaron las diferentes etapas en el desarrollo del biofilm entre 12 y 96 horas de incubación mediante la técnica de Microscopía Confocal, CLSM (por sus siglas en inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*) y Microscopía Electrónica de Barrido a Baja Temperatura, LTSEM (por sus siglas inglés *Low-Temperature Scanning Electron Microscopy*).

El estudio de los biofilms mediante la técnica LTSEM se ha llevado a cabo en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Ciencias Ambientales que pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y en el Centro de Asistencia a la Investigación - Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid, en el caso de la técnica CLSM.

Cada ensayo se realizó por triplicado en tres días independientes. En el caso de microscopía CLSM, en cada ensayo se estudiaron 3 discos (n=9). En el análisis por microscopía LTSEM, en cada ensayo se estudió 1 disco (n=3). En cada disco se estudiaron al menos dos campos diferentes.

4.5.1 Microscopía Laser Confocal (CLSM)

El análisis del biofilm por CLSM, y el posterior tratamiento de las imágenes obtenidas con el programa *Metamorph®*, ha permitido obtener una proyección tridimensional del mismo y observar la disposición espacial de las células

dentro de la matriz que lo compone. Al utilizar los fluorocromos que se citan continuación, se puede analizar y semi-cuantificar el número de bacterias vivas y muertas, así como la tendencia de distribución de las células viables y no viables a lo largo de todo el biofilm.

Previamente al estudio por microscopía, los biofilms generados sobre las diferentes superficies de implantes han sido secuencialmente lavados en 2 mL de PBS estéril tres veces, durante 10 segundos, para retirar las bacterias no adheridas. A continuación, se tiñó con el Kit *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit* (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), que proporciona una combinación de dos fluorocromos: “SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain” y “Ioduro de Propidio red-fluorescent nucleic acid stain”, que se diferencian en sus características espectrales y en su capacidad de penetración en las células bacterianas. El fluorocromo SYTO 9 es capaz de penetrar en todas las bacterias presentes en una muestra, tanto con las membranas celulares intactas como dañadas. En contraste, el Ioduro de Propidio penetra únicamente en bacterias con membranas dañadas, causando una reducción de la fluorescencia del SYTO 9 cuando los dos fluorocromos están presentes en la misma célula. Por tanto, la combinación adecuada de ambos fluorocromos, permite marcar las células bacterianas de una muestra, de forma que las bacterias con sus membranas celulares intactas presentarán fluorescencia verde, mientras que las bacterias con la membrana dañada emitirán fluorescencia roja. La máxima excitación/emisión para estos fluorocromos es de aproximadamente 480/500 nm para SYTO 9 y 490/635 nm para Ioduro de Propidio.

Para obtener la señal óptima de fluorescencia se ha puesto a punto la técnica previamente, utilizando diferentes ratios de concentración de los fluorocromos y diferentes tiempos de tinción. Se ha seleccionado el ratio 1:1 y el tiempo de tinción de 9 ± 1 min.

La observación del biofilm por esta técnica ha permitido, en primer lugar, y al observarlo con el objetivo de 10X, obtener una visión general del biofilm desarrollado y de su estructura. Además permite conocer su espesor o altura. El posterior tratamiento de las imágenes se llevó a cabo con el programa Metamorph, que proporciona el análisis semicuantitativo de las células vivas y muertas que componen el biofilm.

4.5.2 Microscopía Electrónica de Barrido a Baja Temperatura (LTSEM)

La Microscopía LTSEM es una herramienta de análisis de imágenes de alta resolución, que permite examinar las muestras con una mínima alteración de la integridad de la estructura y sin la adición de productos químicos. Los biofilms se estudian en estado de completa hidratación. Por ello, a diferencia de la SEM, permite estudiar la estructura intacta del biofilm, y observar la organización de sus células así como la presencia de polisacárido extracelular a lo largo del mismo.

El proceso se inicia fuera del microscopio:

- Las muestras se montan y se fijan mecánicamente sobre el porta-muestras del sistema de enfriamiento.
- Tras el montaje, las muestras se congelan rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido subenfriado y son transferidas con una unidad de

transferencia en vacío a la cámara de preparación de la muestra, que se encuentra a -180°C .

- En el interior de la cámara, las muestras son crio-fracturadas y posteriormente transferidas con un manipulador a través de una válvula de vacío deslizante a la cámara del microscopio electrónico de barrido, donde fueron parcialmente sublimadas en alto vacío a -90°C durante 2 minutos.
- Las muestras se transfieren de nuevo a la cámara de preparación de la muestra y metalizadas con oro o carbono para su observación y/o análisis. Tras el metalizado, la muestra de nuevo se transfiere a la cámara del microscopio.

4.6 Análisis cualitativo y cuantitativo de las especies bacterianas que forman parte del biofilm generado en contacto con la superficie del implante.

El análisis cualitativo y cuantitativo de las especies bacterianas que forman parte del biofilm en cada uno de los materiales en estudio se ha obtenido mediante el uso de las técnicas de biología molecular como: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), específicas en ambos casos para cada una de las bacterias implicadas.

La técnica engloba la información cualitativa de la PCR convencional además de aportar la cuantificación de las bacterias presentes en la muestra a través de la qPCR.

Cada ensayo se realizó por triplicado en tres días independientes ($n=3$).

4.6.1 Aplicación de la técnica de PCR cualitativa específica para cada bacteria.

El primer paso para desarrollar este objetivo fue la extracción del ADN de todos los biofilms generados. Los discos fueron secuencialmente lavados tres veces en 1 mL de PBS estéril, durante 10 segundos por lavado, para retirar las bacterias no adheridas en el biofilm. A continuación, las muestras se introdujeron en un tubo de plástico que contenía 1 mL de PBS estéril, y fue vorteadado hasta completar la disgregación del biofilm, tras lo cual se procedió a la extracción del ADN de las células que componen el biofilm. Para ello, se empleó el kit de extracción ATP Genomic DNA Mini Kit ATP Biotech Inc. (MP Biomedicals, LLC, Cleveland, OH, EE.UU.) (Figura 9), siguiendo las instrucciones del fabricante.

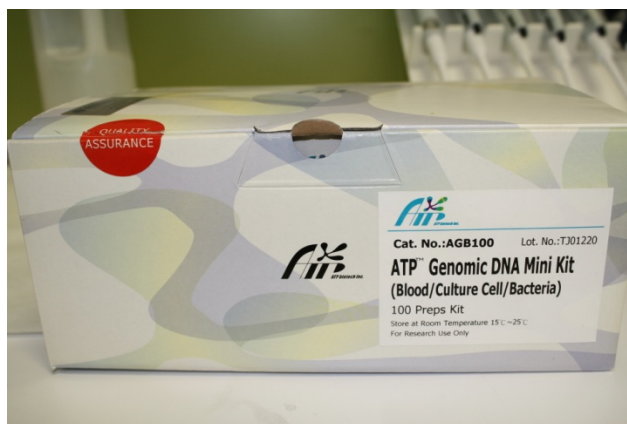


Figura 9 Kit de extracción ATP Genomic DNA Mini Kit ATP Biotech Inc. (MP Biomedicals, LLC, Cleveland, OH, Estados Unidos).

El ADN extraído fue resuspendido en 50µl de agua estéril. Se almacenó a -20°C pendiente de análisis.

Con el objetivo de corroborar que todas las especies con las que se trabajaba se habían incorporado al biofilm (análisis cualitativo) se realizó la técnica de PCR convencional. Para ello, en primer lugar se procedió a la selección de los cebadores o primers específicos para cada una de las bacterias de referencia.

El gen seleccionado para la detección de las seis bacterias fue el gen 16S rRNA. La reacción se realizó en un volumen final de 25µl, que contenía:

- Buffer de PCR 1X, 0,25U de Taq DNA polimerasa (Promega)
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,2mM de cada desoxirribonucleotido
- 2µM de cada Primer.
- 3 µl de ADN

Los ciclos de temperatura en el termociclador incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos para separar las dos hebras de ADN, seguido de 36 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por un minuto o fase de Annealing o Anillamiento en la que los cebadores se unen a su cadena molde complementaria y 72°C por un minuto en la fase de Extensión, con un paso final de 72°C por 10 minutos, quedando a 4°C al terminar los ciclos (Figuras 10 y 11).

Se incluyeron controles positivos y controles negativos. En el control negativo, se sustituyó el DNA por agua destilada estéril. Los controles positivos corresponden al DNA extraído de cultivos puros de las mismas bacterias.



Figura 10. Termociclador. Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid



Figura 11. Pantalla del Termociclador en la que se pueden ver los ciclos de temperatura

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis, en un gel de agarosa a una concentración de 1% en buffer TAE (Tris-acetato-EDTA), habiendo incorporado el gel bromuro de etidio para poder visualizar las bandas en un transiluminador con luz ultravioleta de 300nm.

4.6.2. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Con el objetivo de corroborar que todas las especies con las que se trabajaba se habían incorporado al biofilm (análisis cualitativo), y obtener el número de las mismas incluidas (análisis cuantitativo) se realizó la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Esta técnica, utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN bacteriano presente en la muestra, se llevó a cabo mediante el uso de sondas de hidrólisis TaqMan, que permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas moleculares dependientes de la secuencia, marcadas por dos fluorocromos.

Como en el caso de la PCR cualitativa, el primer paso para desarrollar este objetivo ha sido la extracción del ADN de todos los biofilms generados. Los discos fueron lavados tres veces en 2 mL de PBS estéril, durante 10 segundos por lavado, para retirar las bacterias no adheridas en el biofilm. A continuación, las muestras se introdujeron en un tubo de plástico con 1 mL de PBS estéril, y se sometieron a vorteo hasta completar la disgregación del biofilm, tras lo cual se procedió a la extracción del ADN de las células que componen el biofilm. Para ello, se utilizó el kit de extracción “TecknoKroma”, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue resuspendido en 100µl de agua estéril y almacenado a -20°C hasta su análisis.

Las secuencias de los cebadores o primers [sintetizados por Life Technologies Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.)] y sondas [sintetizados por Life Technologies Invitrogen y Roche], dirigidas en todos los casos al gen 16S rRNA, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Primers y sondas empleadas para la cuantificación del ADN genómico para cada bacteria. Primers y sondas fueron dirigidos contra el gen 16 S rRNA

Bacteria	Secuencia (5'-3')	Altura (pb)	Referencia
<i>So</i>			
Forward	CAACGATACATAGCCGACCTGAG	97	(Presente estudio)
Reverse	TCCATTGCCGAAGATTCC		
Sonda	6FAM-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA -BBQ		
<i>Vp</i>			
Forward	TGCTAATACCGCATACGATCTAACC	66	(30)
Reverse	GCTTATAAATAGAGGCCACCTTTCA		
Sonda	6FAM-CTATCCTCGATGCCGA -TAMRA		
<i>An</i>			
Forward	GGCTGCGATACCGTGAGG	103	(Presente estudio)
Reverse	TCTGCGATTACTAGCGACTCC		
Sonda	6FAM- CCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAT-BBQ		
<i>Pg</i>			
Forward	GCGCTCAACGTTTCAGCC	67	(31)
Reverse	CACGAATTCCGCCTGC		
Sonda	6FAM-CACTGAAGTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA		
<i>Aa</i>			
Forward	GAACCTTAC CTACTCTTGACATCCGAA	80	(32)
Reverse	TGCAGCACCTGTCTCAAAGC		
Sonda	6FAM-AGAAGTCAAGATGGGTTTGTGCCTTAGGG-TAMRA		

<i>Fn</i>			
Forward	GGATTATTGGGCGTAAAGC	162	(32)
Reverse	GGCATTCTACAAATATCTACGAA		
Sonda	6FAM-CTCTACACTTGTAGTTCCG-TAMRA		

So, *S. oralis*; *Vp*, *V. parvula*; *An*, *A. naeslundii*; *Aa*, *A. actinomycetemcomitans*; *Fn*, *F. nucleatum*; *Pg*, *P. gingivalis*.

La reacción se ha realizado en un volumen final de 20µl, que contiene:

- 10µl de 2x master mixture (LC 480 Probes Master; Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania).
- la concentración óptima de primers y sonda (900, 900 y 300 nM para *S. oralis*; 300, 300 y 300nM para *A. naeslundii*; 750, 750 y 450 nM para *V. parvula*; 300, 300 y 200 nM para *A. actinomycetemcomitans*; 300, 300 y 300 nM, para *P. gingivalis*, 600, 600 and 300 nM para *F. nucleatum* y 5 µl de DNA de las muestras de biofilm.

Las muestras fueron sometidas a un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 min. Los análisis se han llevado a cabo con el equipo LightCycler® 480 II thermocycler (Roche). Las placas usadas en el estudio han sido FramStar 480 (4itude; The North Barn; Damphurst Lane, Reino Unido), selladas con QPCR Adhesive Clear Seals (4itude).

Cada muestra de ADN ha sido analizada por duplicado. El valor de Cq que proporciona el equipo describe el número de ciclos de la PCR a los cuales la fluorescencia alcanza la línea base, determinado por el software del equipo. La cuantificación derivada de los datos de Cq obtenidos por qPCR se ha basado en curvas estándar. Para ello, 1 mL de cada una de las seis especies utilizadas en el estudio, a una concentración de 10⁹ UFC/ mL, fue sometido al mismo proceso de extracción de ADN anteriormente mencionado. Se realizaron

diluciones seriadas de cada ADN en agua estéril, con rango de 10^9 - 10^0 UFC/mL, y fueron sometidos a qPCR como se ha descrito. Las curvas estándar se han construido enfrentando los valores de Cq generados en la qPCR frente al log de UFC /mL.

4.7 Análisis estadístico

Los datos fueron calculados como micrómetros (μm) en el caso de la altura alcanzada por los biofilms y como porcentaje (%) en el caso de la vitalidad celular, a partir del área ocupada por las células vivas y las muertas obtenido por el análisis de las micrografías del CLSM mediante el software *Metamorph*® 7.6.

Se realizó un análisis a nivel de experimento para cada parámetro de estudio ($n = 9$). Se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov para cada variable y los datos se expresaron como medias y desviaciones estándar (DS), además se han utilizado Box-plots para la presentación gráfica de los datos.

Para probar el efecto de cada material y/o tiempo de incubación sobre la vitalidad celular, se ha realizado el análisis de la varianza (ANOVA) y para comparaciones múltiples se han utilizado las pruebas post hoc con la corrección de Bonferroni. Los resultados se han considerado estadísticamente significativos a $p < 0,05$. Se empleó el software IBM ® SPSS ® Statistics 19.0 para todos los análisis de datos.

Para comparar los resultados de la PCR cualitativa con la microscopía y la qPCR se realizó el Test de la Q de Cochran.

5. Resultados

5.1 Análisis estructural y evaluación de la viabilidad de los biofilms por CLSM y LTSEM

La morfogénesis de los biofilms de cada disco fueron examinados por CLSM y LTSEM en cada uno de los tiempos (12, 24, 48, 72 y 96 h). El análisis se centró en el estudio de la arquitectura en tres dimensiones, la cual está asociada a la acumulación temprana y posterior formación de una matriz rica en polisacáridos extracelulares (EPS por sus siglas en inglés) en la superficie de los discos y en la vitalidad celular que presenten. Las Figuras 10, 11 y 12 muestran la formación de biofilm para cada material de implante y la Tabla 4 se corresponde con los porcentajes de bacterias viables y espesores alcanzados en los distintos intervalos de tiempo.

En las primeras 12 h tras la inoculación se observa una capa dispersa de bacterias adheridas a las tres superficies de estudio (Figura 10). Las células se organizan como células individuales, como cadenas de estreptococos (Figura 10, flechas rojas), o como agregados multicelulares; también pueden reconocerse los bacilos en forma de huso correspondientes a *F. nucleatum* (Figura 10; flechas blancas). En hidroxiapatita, las imágenes obtenidas por LTSEM revelaron que las células bacterianas se distribuyen sobre la superficie del disco, con escaso EPS, mostrando una organización estructural basada principalmente en la coagregación célula a célula (Figura 10 D). Sin embargo, en la superficie de titanio, el biofilm es rico en microcolonias formando protrusiones rodeado de los filamentos de la especie bacteriana *F. nucleatum* (Figura 12 E), con abundante matriz EPS, la cual se reconoce en la imagen como una masa compacta, brillante, así como una delgada película revistiendo

las células (Figura 12 B, flecha azul). La Figura 14 A muestra la EPS como una masa densa empaquetando las células bacterianas para formar el biofilm, al contrario que la estructura del biofilm en la superficie de zirconio, que se caracteriza por una formación fibrilar de EPS (Figura 12, flecha azul) interconectando bacterias como células individuales, cadenas de estreptococos cortas así como microcolonias (Figura 12 C, flecha amarilla).

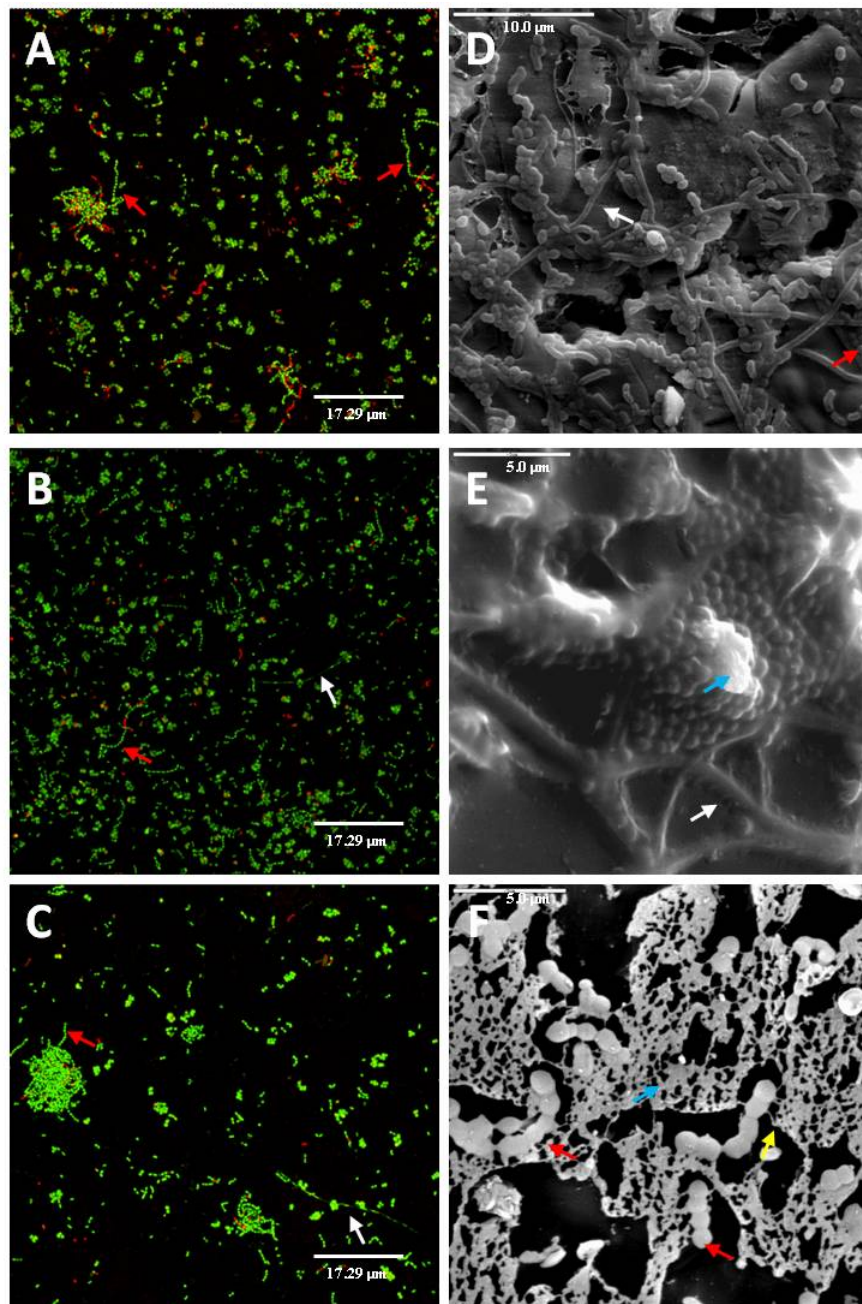


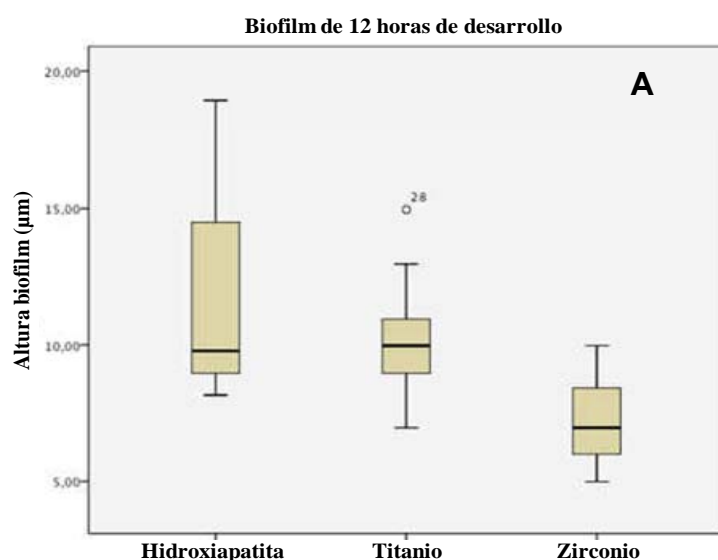
Figura 12. CLSM (A, B y C) y LTSEM (D, E y F) las imágenes muestran el biofilm crecido tras 12 h de incubación, sobre hidroxiapatita (A, D), titanio (B, E), y zirconio (C, F). La proyección máxima (CLSM) así como imágenes cercanas (LTSEM) de los biofilms muestran células bacterianas repartidas sobre la superficie de los discos. Las células se organizan como células individuales, como las cadenas de estreptococos (flechas rojas), o como agregados multicelulares; también pueden reconocerse las barras en forma de huso del *F. nucleatum* (flechas blancas). Las flechas azules indican la presencia de la matriz de polisacárido extracelular (EPS), se reconoce en la imagen como una masa compacta de mayor brillo. La flecha amarilla indica las proyecciones filamentosas de EPS.

La Tabla 4 muestra el espesor (μm) y la vitalidad celular (%) que alcanzaron los biofilms en cada una de las superficies obtenidas por CLSM. Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la altura alcanzada en los biofilms en hidroxiapatita y zirconio a las 12 h ($P<0,05$). No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la vitalidad de los biofilms entre los tres materiales (Figura 13 A y B).

Tabla 4. Cambios observados en vitalidad y espesor en el biofilm.

Biofilm muestra	12 h (n=9)			48 h (n=9)			72 h (n=9)		
	Ha	Ti	Zn	Ha	Ti	Zn	Ha	Ti	Zn
Espesor (μm)									
Media	11,6	10,2	7,4	21,2	16,1	8,9	24,8	23,2	11,5
Desviación estándar	3,8	2,5	1,8	1,9	3,2	2,8	2,4	7,5	5,6
Vitalidad (%)									
Media	87,2	85,6	83,7	93,9	88,5	88,2	73,8	83,7	79,9
Desviación Estándar	8,5	7,4	8,5	4,0	7,1	6,4	21,3	11,1	12,1

Ha: Hidroxiapatita; Ti: Titanio; Zn: Zirconio



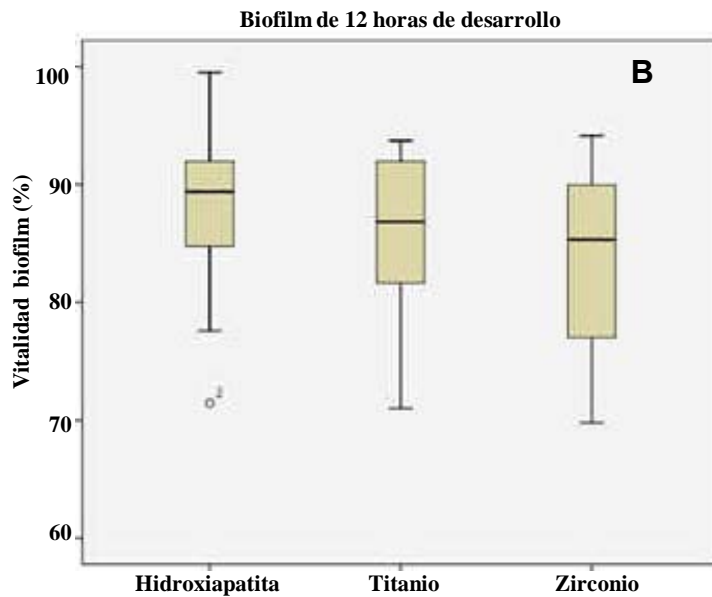


Figura 13. Representación gráfica en Box-plot de: (A) la altura (μm) y (B) la vitalidad (%) alcanzada por los biofilms de 12 horas de evolución generados sobre hidroxiapatita, titanio y zirconio.

En las siguientes 24 horas de desarrollo la complejidad y el tamaño de las estructuras aumentan considerablemente. A través de LTSEM puede observarse que la estructura del biofilm en todos los casos se muestra más enmarañada y rodeada por la matriz de EPS. En la superficie de hidroxiapatita se ve una capa de células agrupadas en microcolonias o clusters formando prominencias. Mientras tanto, grandes masas de células bacterianas caracterizan el biofilm en la superficie de titanio (Figura 14 B). En las superficies de zirconio, los biofilms son más frágiles, mostrando áreas con huecos entre los grupos o “clusters” de bacterias. Considerando el espesor alcanzado por los biofilms después de 48 h de desarrollo (Tabla 4 y Figura 15 A), se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos hidroxiapatita con titanio o zirconio ($p < 0,05$ en ambos casos) así como entre titanio y zirconio ($p < 0,05$). Sin embargo, al comparar la vitalidad no

se detectaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4 y Figura 15 B).

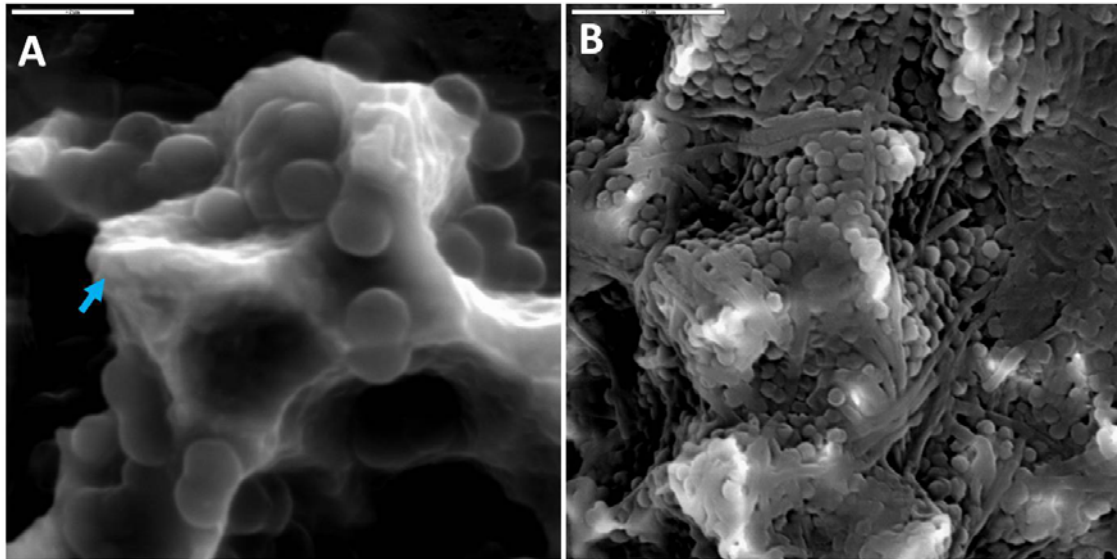


Figura14. Las imágenes de LTSEM muestran la estructura del biofilm en disco de titanio después de (A) 12 horas y (B) 24 horas de incubación. La imagen A muestran EPS como una densa masa envolviendo las células bacterianas para configurar el biofilm, la cual se reconoce en la imagen como una masa compacta de gran brillo (flecha azul); barra de escala =2 μm . La imagen B muestran una imagen más cercana del biofilm, en el que se ven largos canales dentro de la estructura; barra de escala =5 μm .

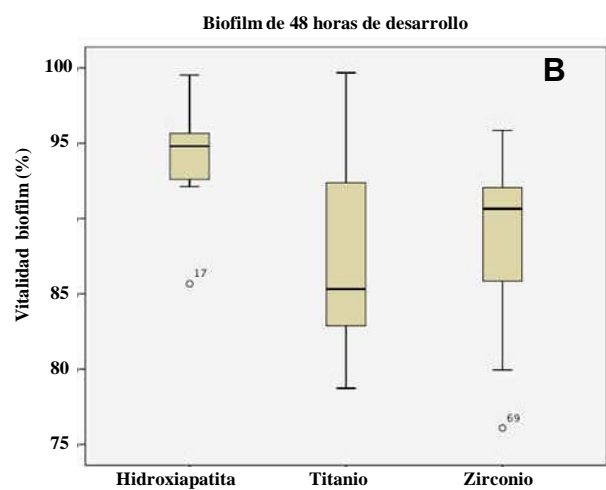
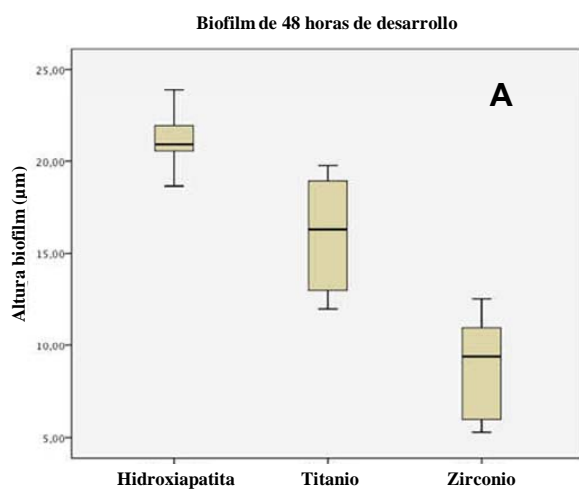


Figura 15. Representación gráfica en Box-plot de: (A) la altura (μm) y (B) la vitalidad (%) alcanzada por los biofilms de 48 horas de evolución generados sobre hidroxiapatita, titanio y zirconio.

En el biofilm de 72h de desarrollo se mantuvieron las variaciones en la arquitectura entre los distintos materiales. El biofilm en hidroxiapatita cubre por entero la superficie de los discos con capas homogéneas de células combinadas con grupos de bacterias apiladas, mostrando canales en el interior de la estructura (Figura 16 A).

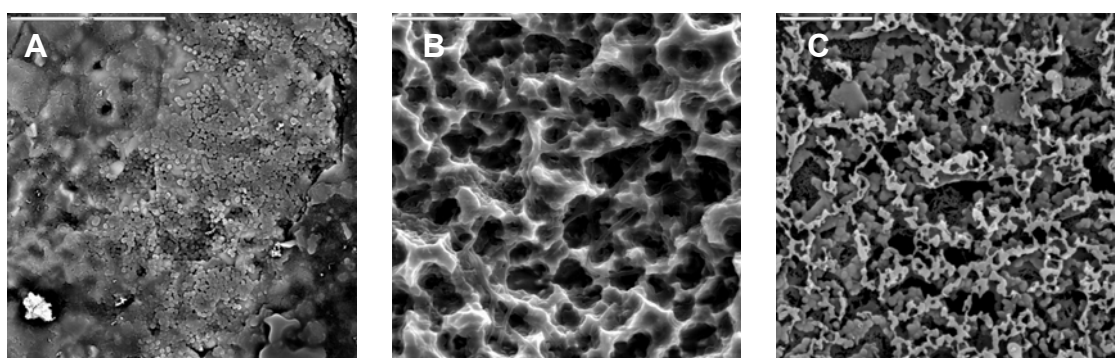


Figura 16. Las imágenes de LTSEM muestran la estructura del biofilm en (A) hidroxiapatita, (B) titanio y (C) zirconio de discos tras 72 h de incubación. Se pueden apreciar variaciones en la arquitectura de los biofilms en los diferentes materiales: los biofilms en hidroxiapatita (A) cubren la superficie de los discos con capas homogéneas planas de células combinadas con grupos de bacterias formando pilas o torres y mostrando canales dentro de la estructura; barra de escala: $20\mu\text{m}$. Biofilms en la superficie de titanio (B), adquiere una arquitectura en forma de cráter, con aspecto de panal de abeja rico en matriz EPS; barra de escala= $10\mu\text{m}$. En cambio, en la superficie de zirconio (C), los biofilms muestran apariencia de tela de araña, con una matriz EPS amorfa rodeando y conectando a cada una de las bacterias; barra de escala= $5\mu\text{m}$.

El biofilm, con bacterias asociadas como microcolonias, mostró una apariencia de tela de araña, con una matriz extracelular rodeándolas e interconectándolas entre sí (Figura 16 C). Mediante CLSM se encontraron diferencias estadísticamente significativas solamente en el espesor al comparar el biofilm

de zirconio con el de titanio e hidroxiapatita ($p < 0,01$ en ambos casos) (Figura 17 A).

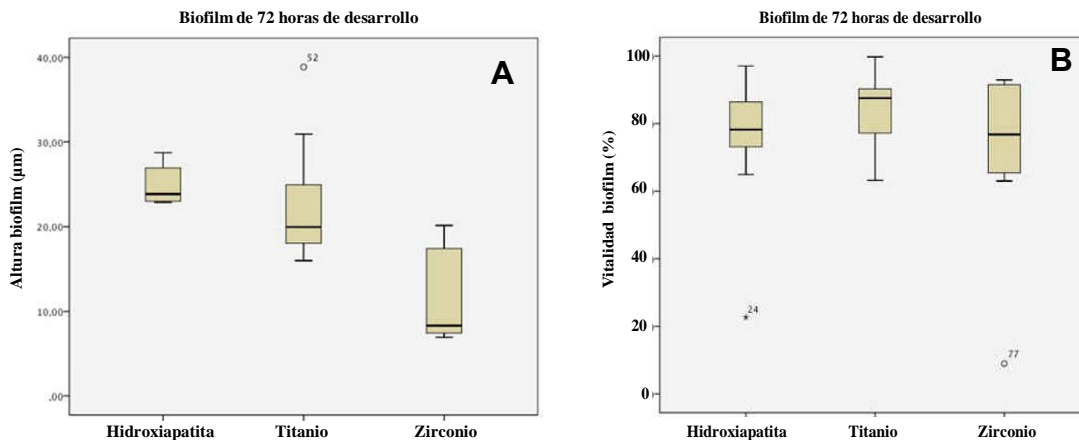


Figura 17. Representación gráfica en Box-plot de: (A) la altura (µm) y (B) la vitalidad (%) alcanzada por los biofilms de 72 horas de evolución generados sobre hidroxiapatita, titanio y zirconio.

Estas características morfológicas se mantuvieron en el tiempo, desde las 72 a las 96 horas de desarrollo; la superficie de los discos aparecía completamente cubierta por células bacterianas asociadas en biofilms en todos los casos, combinando en el caso de hidroxiapatita y titanio capas homogéneas con clústeres celulares formando altas prominencias de hasta 40,0 µm, y una estructura más laminar y sin grandes prominencias, de solo 20,1 µm como máximo, sobre zirconio, con un descenso en la tasa de vitalidad bacteriana en los tres casos.

Debido a la ausencia de cambio estructural de los biofilms generados a partir de las 72 horas, sin presentar diferencias estadísticamente significativas, se sugiere que el biofilm habría alcanzado un estado de equilibrio después de 72 h de desarrollo.

5.2 Análisis cualitativo de los biofilms mediante PCR

Las Figuras 16, 17, 18, 19 y 20, muestran las imágenes de la amplificación por PCR 16SrRNA de cada de una de las bacterias usadas introducidas en el modelo de biofilm.

En las tres superficies estudiadas se pudo observar la presencia de las seis bacterias desde el biofilm de 12 h (Figura 16); estos resultados coinciden con los obtenidos con la qPCR y con microscopía CLSM y LTSEM.

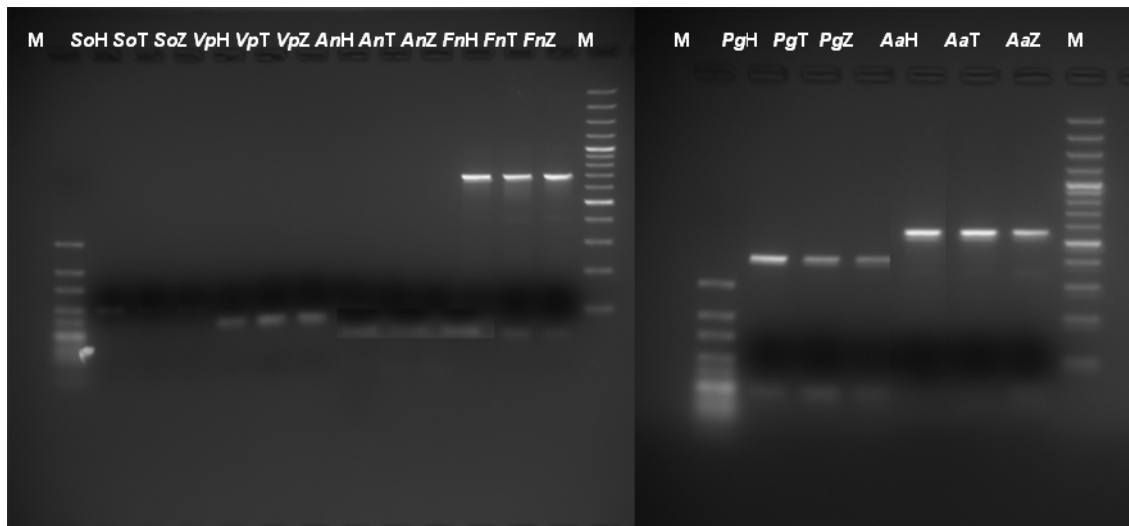


Figura 16. Visualización en geles de agarosa del producto de PCR de biofilms de 12 horas de incubación

M: Marcador (izquierda: 10pb; derecha: 100pb)

So H, T, Z: *S.oralis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Vp H, T, Z: *V. parvula* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

An H, T, Z: *A. naeslundii* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Fn H, T, Z: *F. nucleatum* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Pg H, T, Z: *P. gingivalis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Aa H, T, Z: *A. actinomycetemcomitans* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

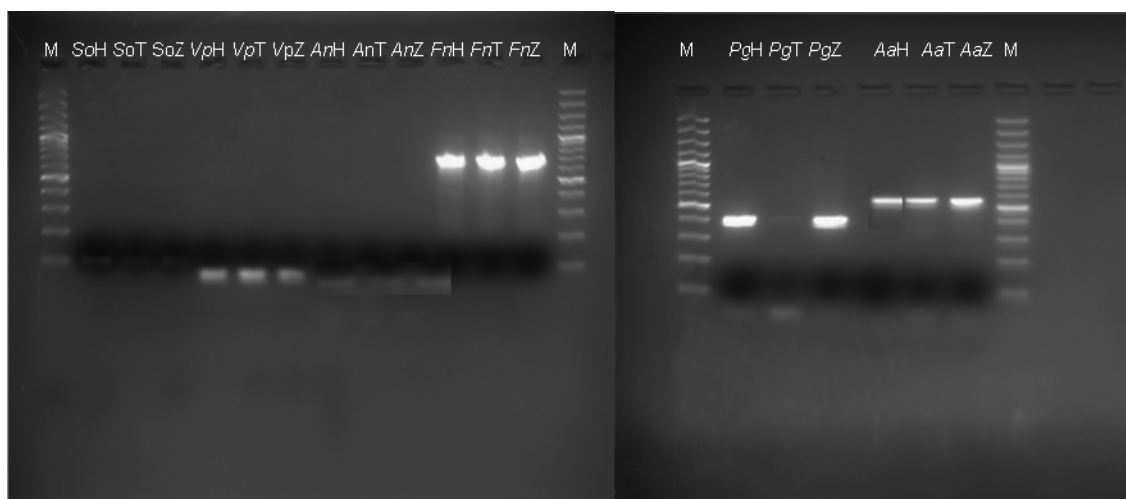


Figura 17 Visualización en geles de agarosa del producto de PCR de biofilms de 24 horas de incubación

M: Marcador (izquierda: 10pb; derecha: 100pb)

So H, T, Z: *S.oralis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Vp H, T, Z: *V. parvula* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

An H, T, Z: *A. naeslundii* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Fn H, T, Z: *F. nucleatum* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Pg H, T, Z: *P. gingivalis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Aa H, T, Z: *A. actinomycetemcomitans* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

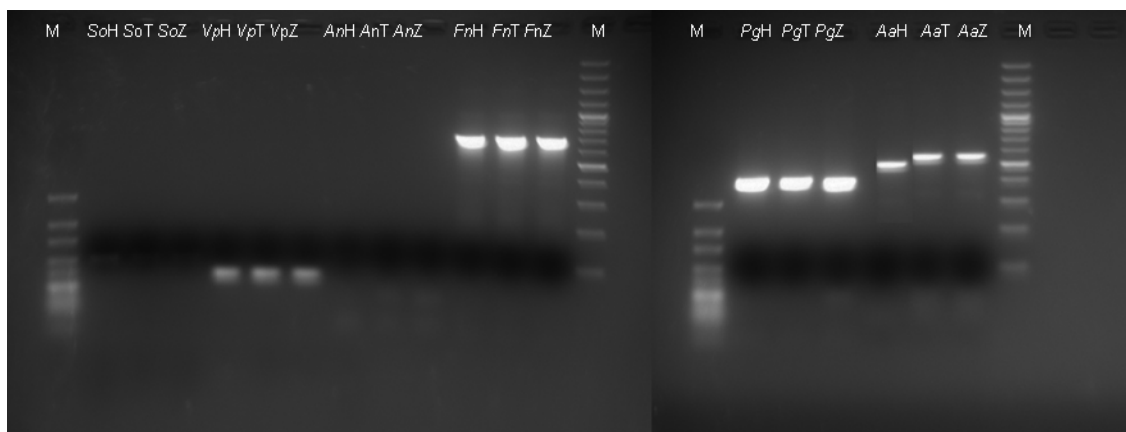


Figura 18 Visualización en geles de agarosa del producto de PCR de biofilms de 48 horas de incubación

M: Marcador (izquierda: 10pb; derecha: 100pb)

So H, T, Z: *S.oralis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Vp H, T, Z: *V. parvula* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

An H, T, Z: *A. naeslundii* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Fn H, T, Z: *F. nucleatum* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Pg H, T, Z: *P. gingivalis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Aa H, T, Z: *A. actinomycetemcomitans* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

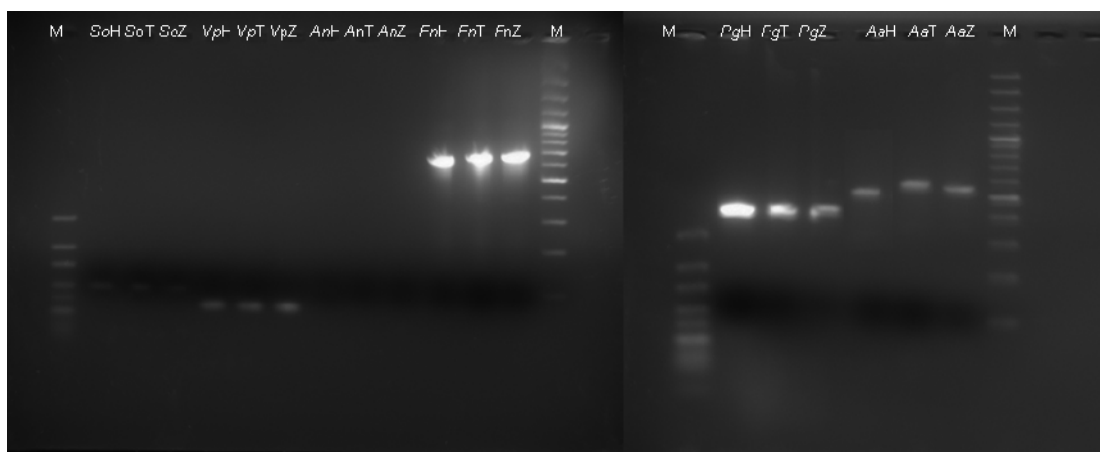


Figura 19 Visualización en geles de agarosa del producto de PCR de biofilms de 72 horas de incubación

M: Marcador (izquierda: 10pb; derecha: 100pb)

So H, T, Z: *S.oralis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Vp H, T, Z: *V. parvula* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

An H, T, Z: *A. naeslundii* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Fn H, T, Z: *F. nucleatum* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Pg H, T, Z: *P. gingivalis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Aa H, T, Z: *A. actinomycetemcomitans* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

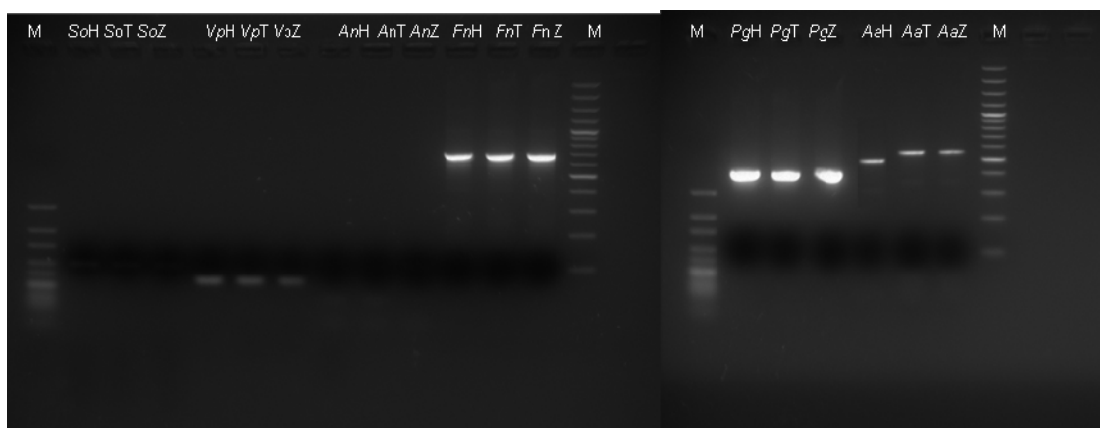


Figura 20 Visualización en geles de agarosa del producto de PCR de biofilms de 96 horas de incubación

M: Marcador (izquierda: 10pb; derecha: 100pb)

So H, T, Z: *S.oralis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Vp H, T, Z: *V. parvula* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

An H, T, Z: *A. naeslundii* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Fn H, T, Z: *F. nucleatum* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Pg H, T, Z: *P. gingivalis* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Aa H, T, Z: *A. actinomycetemcomitans* Hidroxiapatita, Titanio, Zirconio

Se ha realizado el Test de la Q de Cochran para poder comparar los resultados de la PCR cualitativa con los obtenidos con microscopía y con la qPCR. La Tabla 5 muestra, como ejemplo, los datos de *S.oralis* en cada uno de los tiempos estudiados y en los tres materiales. Para todas las bacterias se obtuvo el mismo resultado (datos no mostrados).

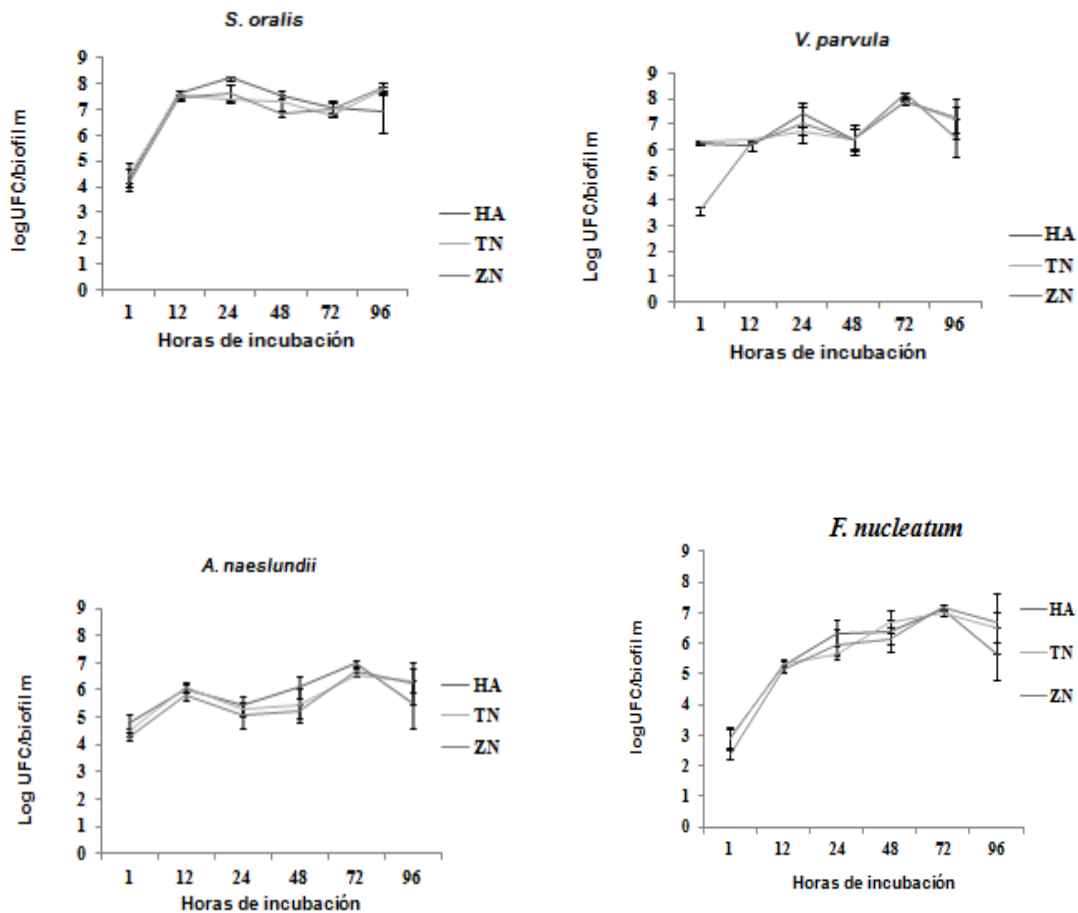
Tabla 5. Recogida de datos de *S.oralis* en los cinco tiempos estudiados y en los tres materiales (k=3), donde 1= presencia de la bacteria y 0= ausencia. (So: *Streptococcus oralis*, Ha: Hidroxiapatita; Ti: Titanio; Zn: Zirconio).

So	Ha	Ti	Zn	Total filas	Total filas ²
12	1	1	1	3	9
24	1	1	1	3	9
48	1	1	1	3	9
72	1	1	1	3	9
96	1	1	1	3	9
Total	5	5	5	$\sum Tf=15$	$\sum Tf^2=45$
columnas(k)					
(Tc)					

Una vez calculada la Razón crítica (Qs) y comparada con el Valor crítico tabulado ($\chi^2 \alpha$) a dos colas, $\chi^2 0,05 (2) = 5,991$, dio el siguiente resultado: $Qs < \chi^2 0,05 (2)$: $0 < 5,991$, es decir: no estadísticamente significativo al nivel del 5% y a dos colas. Se interpreta, por tanto, que las seis bacterias están presentes en todos los tiempos y en los tres materiales y no hay diferencias estadísticamente significativas.

5.3 Análisis cuantitativo de los biofilms mediante qPCR

La Figura 15 muestra los perfiles cinéticos de las seis bacterias que forman el biofilm (UFC/biofilm) desarrollado en superficie de hidroxiapatita, titanio y zirconio, obtenidos por qPCR a diferentes tiempos de incubación (12, 24, 48, 72 y 96 h). Se puede observar que el perfil dinámico de las especies bacterianas, durante todo el tiempo, fue evolucionando en las tres superficies de una manera similar.



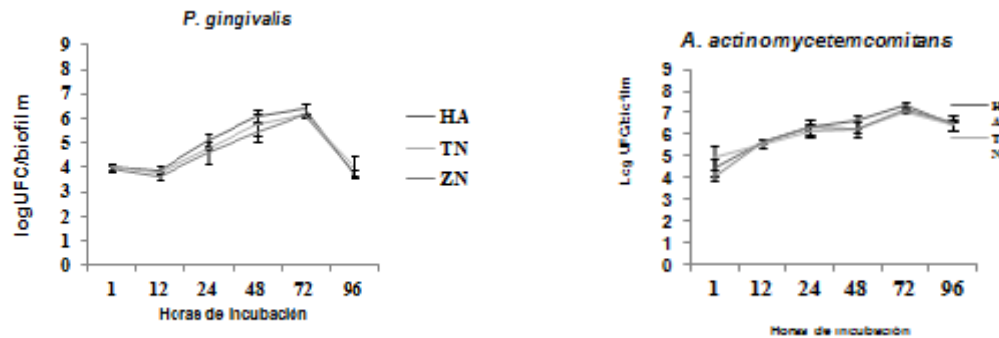
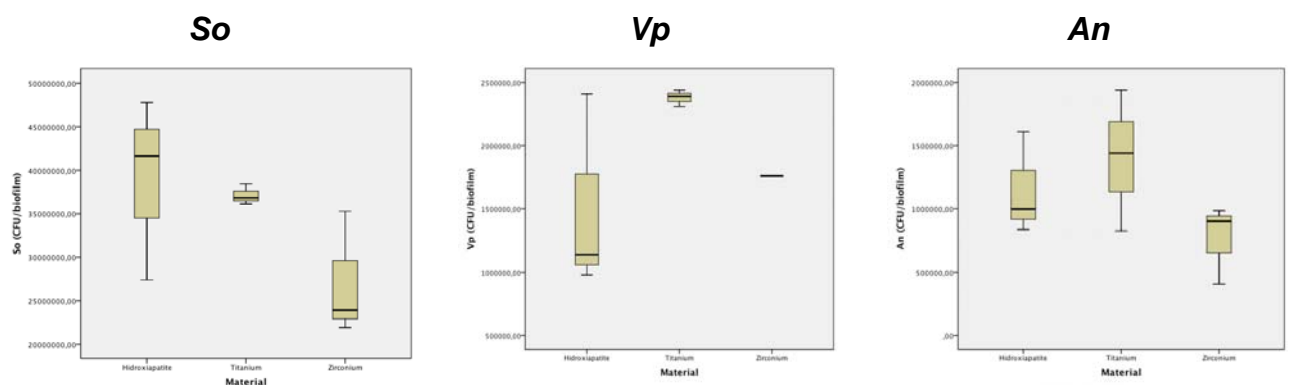


Figura 21. Cinética de incorporación de las seis especies bacterianas presentes en el biofilm (log UFC/biofilm) en cada uno de los materiales empleados en el estudio: hidroxiapatita (HA), titanio (TN) y zirconio (ZN), obtenida por qPCR de los biofilm de 1a 96 h de incubación, usando primers específicos y sondas directamente sobre el gen 16S rRNA

Desde las 12 h de incubación, las seis bacterias se pudieron detectar en las tres superficies estudiadas, (Figura 21) siendo predominantes *S. oralis*, *V. parvula* y *A. naeslundii* (Figura 21). También pudieron detectarse *F. nucleatum* y colonizadores tardíos, pero en menor proporción. Estos resultados coinciden con los observados con la microscopía por CLSM y LTSEM, donde la biomasa observada a las 12 h estaba representada principalmente por cadenas de cocos, correspondientes a *S. oralis*, pero también cocobacilos y bacilos, incluyendo *F. nucleatum* (Figura 22).



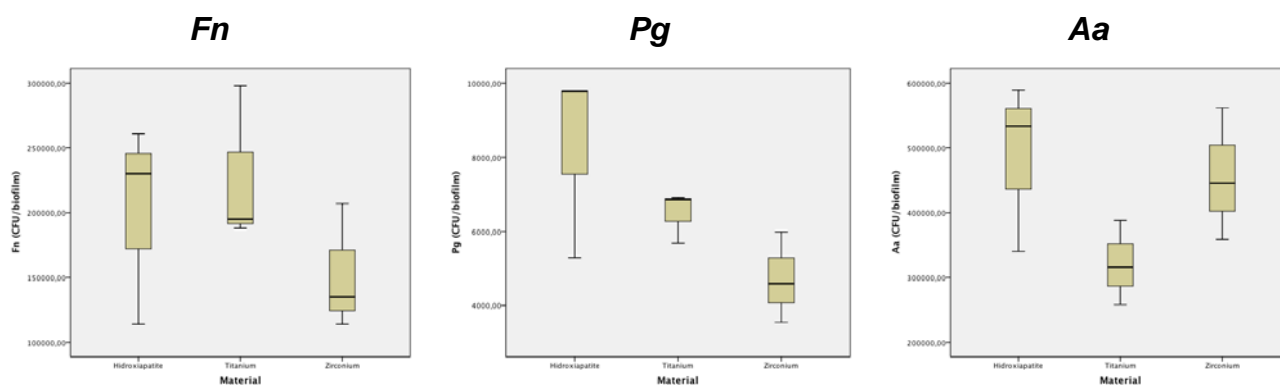


Figura 22. Representación gráfica en Box-Plot de UFC/biofilm de 12 h en los tres materiales

Se pudo apreciar un aumento en el número de colonizadores primarios a las 24 horas de incubación, que llegaron a alcanzar las 10^8 UFC/biofilm en el caso de *S. oralis*; sólo al evaluar esta especie bacteriana se detectaron diferencias estadísticamente significativas a las 24 h de madurez entre los biofilms desarrollados en hidroxiapatita frente a titanio y zirconio ($p < 0,01$ en ambos casos) (Figura 23).

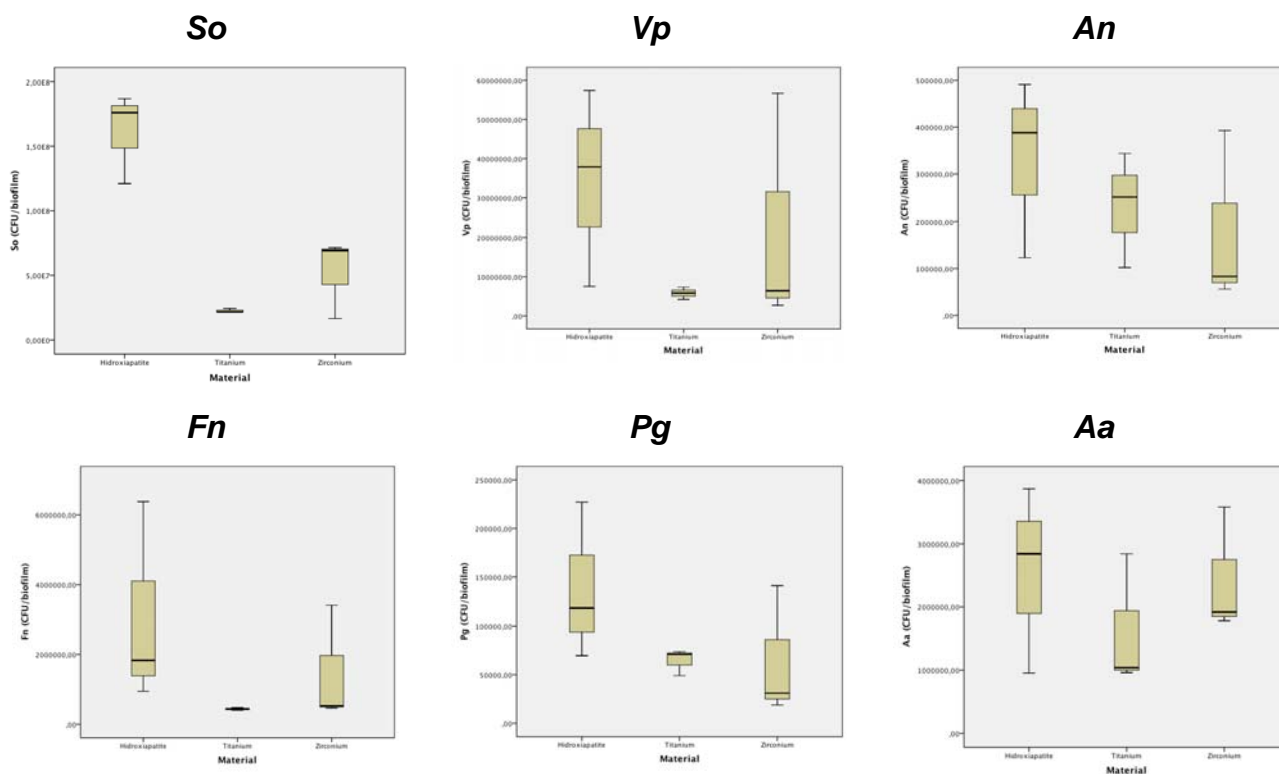


Figura 23. Representación gráfica en Box-Plot de UFC/biofilm de 24 h en los tres materiales

A las 48 h de desarrollo se observó un importante aumento en el número de colonizadores primarios, mientras que los colonizadores secundarios y tardíos se incorporaban lentamente al biofilm (Figura 24), lo que coincide con los resultados obtenidos con la microscopía al mismo tiempo de incubación.

Tras 72 h el biofilm alcanza la madurez en las tres superficies de estudio (Figura 25) y no se observa aumento de células a las 96 h (Figura 26), al igual que con microscopía.

Todas las bacterias incluidas en los biofilms de hidroxiapatita, excepto el *S. oralis*, mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de UFC/biofilm obtenidas a las 72 h con el número de células obtenidas en el resto de tiempos analizados (12, 24, 48, 96), mientras que para *S. oralis* las diferencias estadísticamente significativas se observaron a las 24 h.

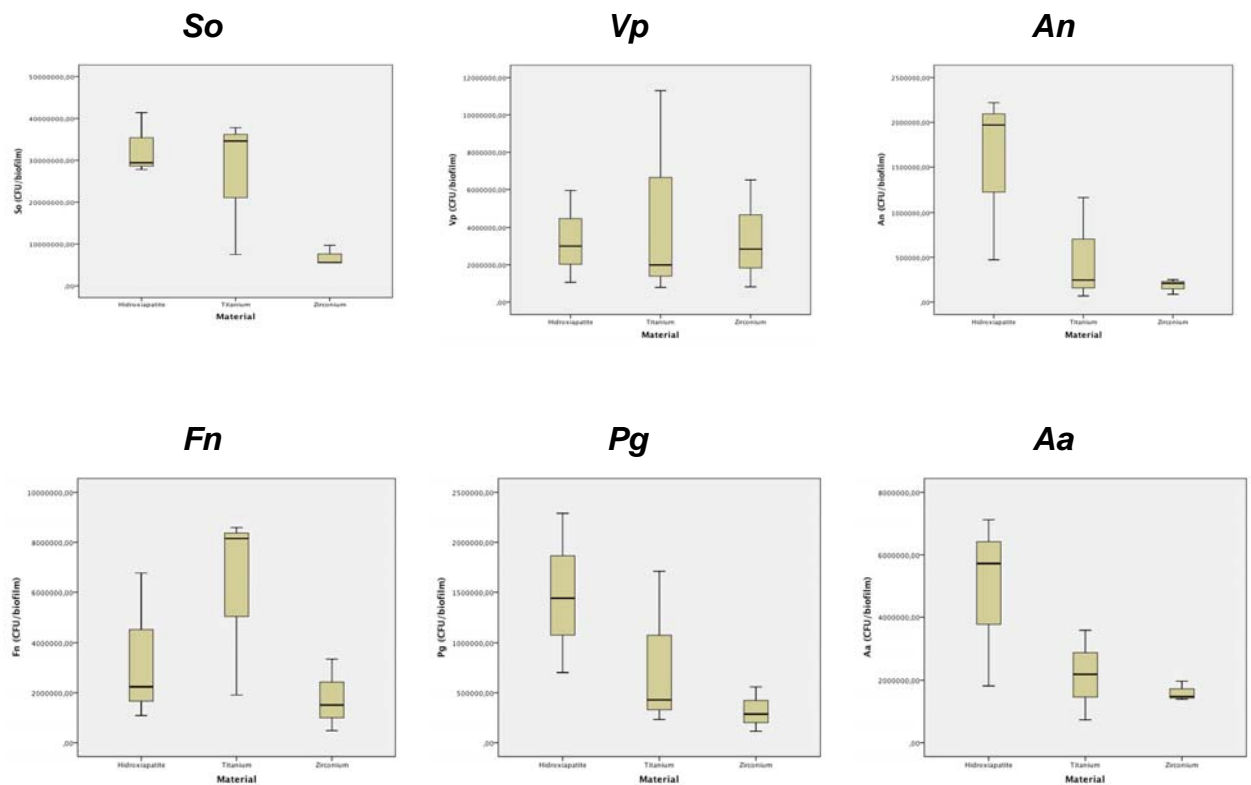


Figura 24. Representación gráfica en Box-Plot de UFC/biofilm de 48 h en los tres materiales

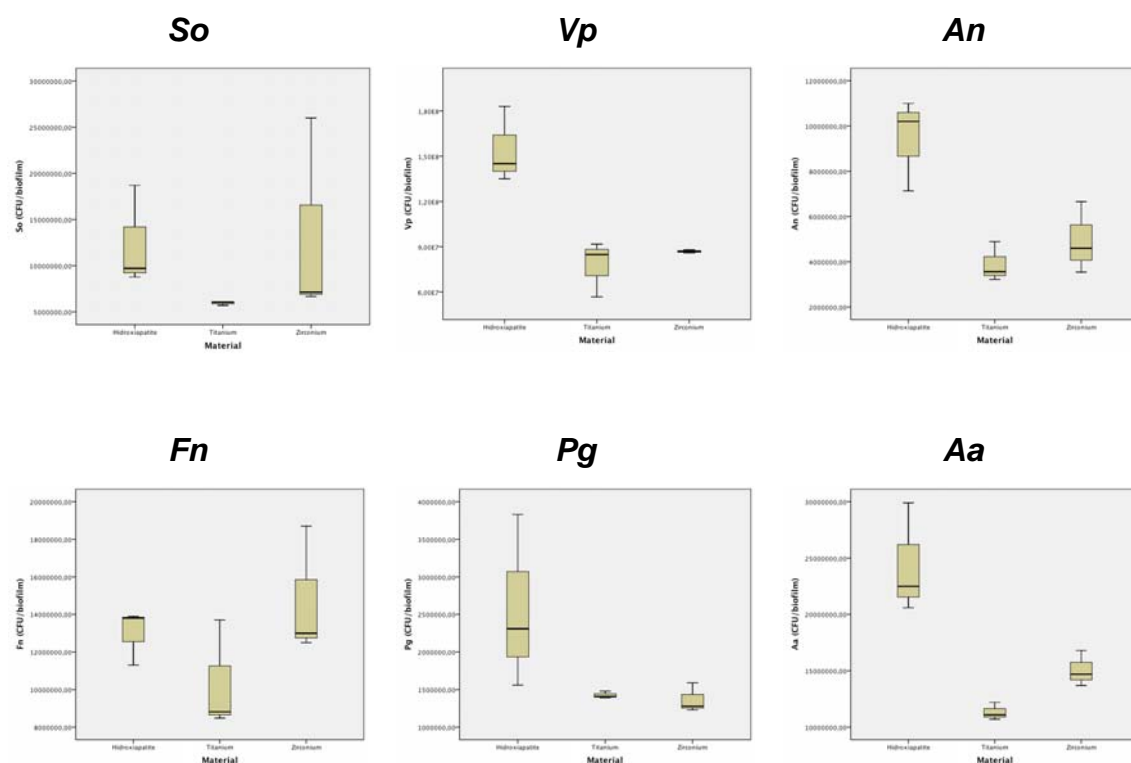


Figura 25. Representación gráfica en Box-Plot de UFC/biofilm de 72 h en los tres materiales

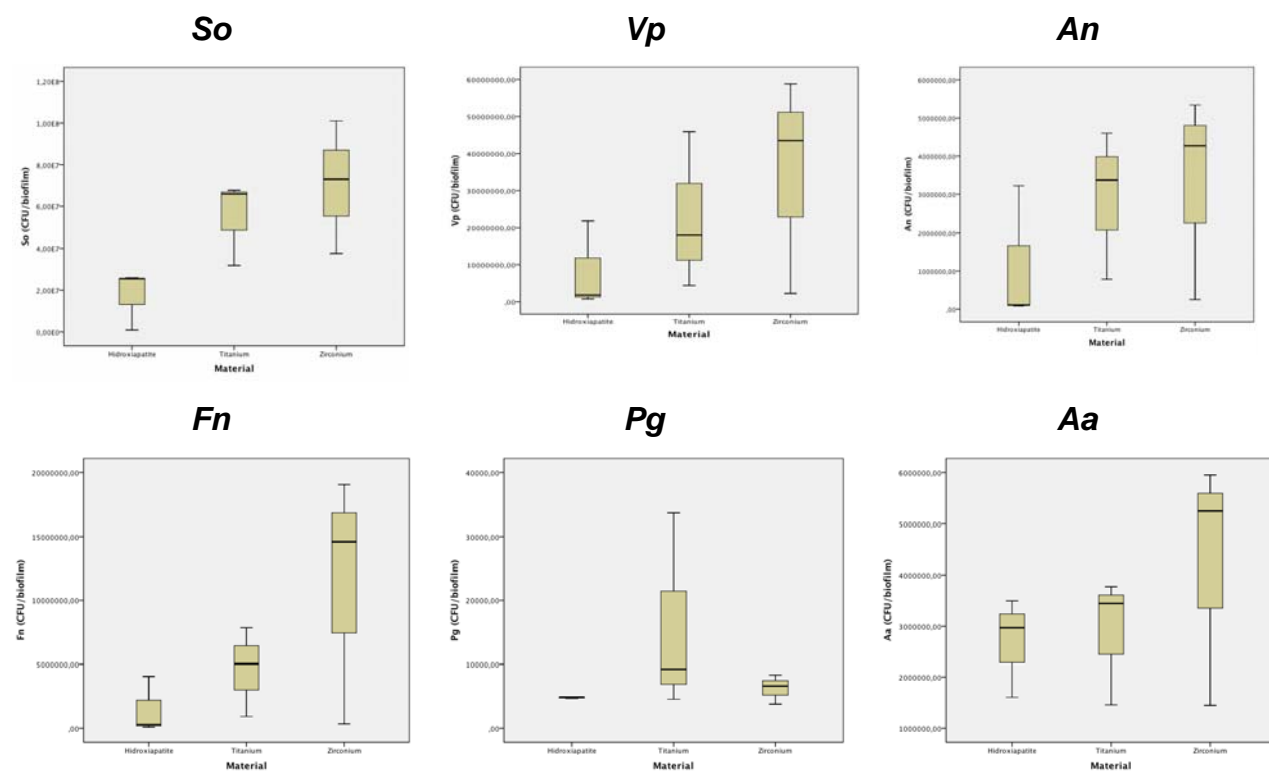


Figura 26. Representación gráfica en Box-Plot de UFC/biofilm de 96 h en los tres materiales

En la superficie de titanio, como ocurrió en hidroxiapatita, *V. parvula*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de UFC/biofilm obtenidas a las 72 h con el número de células obtenidas en el resto de tiempos analizados (12, 24, 48, 96), sólo hasta 24 h para *F. nucleatum* y por encima de las 48 h para *A. naeslundii*. En esta superficie, *S. oralis* mostró diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos el número de UFC/biofilm obtenidas a las 96 h con los resultados obtenidos a las 72 h.

En los biofilms de zirconio, similares a la superficie de titanio, *V. parvula*, *A. actinomycetemcomitans*, y *P. gingivalis* mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de UFC/biofilm obtenidas a las 72 h con el número de células obtenidas en el resto de tiempos analizados (12, 24, 48, 96 h), sólo hasta 48 h para *F. nucleatum* y *A. naeslundii*. De la misma manera, *S. oralis* mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de UFC/biofilm obtenidas a las 96 h con los resultados obtenidos a las 48 h y 72 h.

Cuando se compararon UFC/biofilm en los distintos tiempos entre los tres materiales, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los biofilms en hidroxiapatita *versus* titanio y zirconio, pero no entre los materiales de implantes. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de *S. oralis* a las 24 h en hidroxiapatita al compararlo con titanio o zirconio ($p < 0,01$ en ambos casos). Cuando los biofilms

alcanzaron el estado maduro a las 72 h, se pudo observar cómo el biofilm en hidroxiapatita mostraba un elevado número total de bacterias, siendo éste el doble del número encontrado en los otros dos materiales (Tabla 5).

Tabla 5. Número de especies bacterianas (UFC/biofilm) obtenidas por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real en el biofilm de 72 h de desarrollo en los tres materiales.

Bacteria	Bacterias [UFC/biofilm (desviación estándar)]		
	Material discos		
	Hidroxiapatita	Titanio	Zirconio
<i>S. oralis</i>	$1,2 \times 10^7$ ($5,5 \times 10^6$)	$5,9 \times 10^6$ ($2,1 \times 10^5$)	$1,3 \times 10^7$ ($1,1 \times 10^7$)
<i>V. parvula</i>	$1,5 \times 10^8$ ($2,5 \times 10^7$)	$7,8 \times 10^7$ ($1,9 \times 10^7$)	$8,7 \times 10^7$ ($1,1 \times 10^6$)
<i>A. naeslundii</i>	$9,4 \times 10^6$ ($2,0 \times 10^6$)	$3,9 \times 10^6$ ($8,8 \times 10^5$)	$4,9 \times 10^6$ ($1,6 \times 10^6$)
<i>F. nucleatum</i>	$1,3 \times 10^7$ ($1,5 \times 10^6$)	$1,0 \times 10^7$ ($2,9 \times 10^6$)	$1,5 \times 10^7$ ($3,4 \times 10^6$)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	$2,4 \times 10^7$ ($4,9 \times 10^6$)	$1,1 \times 10^7$ ($7,8 \times 10^5$)	$1,5 \times 10^7$ ($1,6 \times 10^6$)
<i>P. gingivalis</i>	$2,6 \times 10^6$ ($1,2 \times 10^6$)	$1,4 \times 10^6$ ($4,7 \times 10^4$)	$1,4 \times 10^6$ ($2,0 \times 10^5$)
Total bacterias (suma células)	$2,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en *S. oralis*, *A. naeslundii* y *A. actinomycetemcomitans* entre hidroxiapatita y titanio o zirconia ($p < 0,05$ en los dos casos). Comparando titanio y zirconio no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de bacterias obtenidas por qPCR ($p > 0,05$), aunque el número de bacterias totales fue ligeramente superior en el biofilm de zirconia, principalmente por la presencia de colonizadores primarios *S. oralis*, *V. parvula* y *A. naeslundii* (Tabla 5).

6. Discusión

En este estudio se ha realizado un análisis estructural y cuantitativo de la formación *in vitro* de un biofilm representativo del encontrado en la zona periimplantaria, sobre material usado en implantes de titanio y zirconio y en hidroxiapatita como control natural.

Los resultados obtenidos han corroborado la idoneidad del modelo de biofilm *in vitro* empleado como una herramienta para desarrollar biofilms periimplantarios *in vitro* y han confirmado su aplicabilidad para evaluar problemas en la terapia de implantes, como por ejemplo el efecto de la superficie de implantes en la formación de biofilm. Los resultados demostraron la formación de biofilms bacterianos en las superficies de implantes empleadas y que la formación *in vitro* de biofilms en la superficie de implantes ocurre de manera similar a como ocurre en la dentición natural, representada por el material de hidroxiapatita.

El presente estudio no ha encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el número de bacterias (obtenido por qPCR) involucradas en el desarrollo del biofilm periimplantario maduro en titanio y zirconio; sin embargo sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo de la estructura del biofilm, observado por CLSM y LTSEM.

Los microorganismos incluidos en el modelo de biofilm periimplantario *in vitro* están en concordancia con la microbiota existente en implantes *in vivo*, tanto con microorganismos asociados con implantes sanos, como con implantes fracasados (Furst et al. 2007, Mombelli et al. 1987, Shibli et al. 2008).

Se ha demostrado en numerosos estudios que la microbiota en el medio ambiente oral tiene una fuerte influencia en la composición de la carga bacteriana que se encuentra en desarrollo alrededor de los implantes (Lang y Berglundh 2011), siendo ésta similar a la que se encuentra alrededor de los dientes naturales. Los microorganismos incluidos en este modelo *in vitro* de biofilm periimplantario coinciden con la microbiota presente en las zonas periimplantarias *in vivo* (Quirynen et al. 2006, Kumar et al. 2012, Furst et al. 2007, Do Nascimento et al. 2013, Socransky et al. 1998, Shibli et al. 2008, Mombelli et al. 1987, Tabanella et al. 2009), incluyendo especies bacterianas encontradas con frecuencia alrededor de los dientes naturales como colonizadores tempranos y tardíos, que pertenecen a distintos grupos o complejos según lo descrito por Socransky et al. (Socransky et al. 1998). Por otra parte, entre las bacterias seleccionadas, se incluyen *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*, que han sido identificadas como las especies más fuertemente asociadas con periodontitis y periimplantitis (Rabelo de Oliveira et al. 2012); estas bacterias están comúnmente asociadas con las enfermedades periodontales y poseen factores de virulencia que podrían ser importantes para estudiar la progresión de la periimplantitis y su tratamiento (Quirynen et al. 2002, Listgarten y Lai 1999, Mombelli et al. 2001, Papaioannou et al. 1996).

Los análisis estructurales revelaron que todos los materiales testados son susceptibles de permitir la formación de biofilm. Sin embargo, las diferencias entre los distintos materiales aparecieron rápidamente reflejadas en la estructura tridimensional de los biofilms jóvenes, las cuales se mantuvieron en todos los tiempos estudiados. A pesar de la inherente variabilidad inter e intra

experimento en el desarrollo de los biofilms *in vitro*, el estudio ha mostrado que en los biofilms de zirconio se encontraron diferencias estadísticamente significativas en lo referente al espesor alcanzado al compararlo con titanio e hidroxiapatita. Además en zirconio los biofilms adquieren una estructura más fina, como de tela de araña, mientras que hidroxiapatita y titanio mostraron una estructura en capas homogéneas de células, observado por LTSEM.

Hasta ahora, muy poco se ha escrito sobre el desarrollo de la estructura del biofilm en tres dimensiones, la cual está asociada con la acumulación temprana y posterior formación de la matriz rica en polisacáridos extracelulares (EPS). LTSEM a diferencia de SEM provee imágenes de biofilms hidratados, los cuales preservan la integridad de los polímeros hidratados, que están muy relacionados con la resistencia a antibacterianos y pueden ayudar a entender la distinta respuesta de biofilms desiguales. Algunos estudios que emplean SEM, obtienen resultados similares cuando comparan superficies de zirconio y titanio *in vivo* durante 24 horas y encuentran que el porcentaje de área cubierta por el biofilm en zirconio fue menor que para el titanio (Scarano et al. 2004).

A la inversa, comparando el número de bacterias obtenido por qPCR en el biofilm maduro formado en dos materiales distintos de implantes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los datos sugieren que las distintas superficies de implantes son igual de susceptibles para la acumulación de placa y que los diferentes sustratos no se asociaron con un aumento en el número o la presencia de especies bacterianas, no influyendo en los resultados microbiológicos.

El análisis molecular de los biofilms desarrollado en los tres materiales por qPCR reveló que, tras la formación de la película adquirida, se produce la fijación bacteriana en las tres superficies, conducida por los colonizadores iniciales y seguida por adherencia de célula a célula de los colonizadores secundarios y tardíos. La dinámica de crecimiento observada dentro de los biofilms es consistente con el modelo anteriormente publicado (Sánchez et al. 2011) así como lo que sucede *in vivo* (Tabanella et al. 2009), donde el medio ambiente ecológico alrededor de los implantes y los dientes es el mismo y los principios básicos de la formación de biofilm son similares (Lee y Wang 2010). Al cabo de 12 horas de incubación, las seis especies bacterianas fueron detectadas en los biofilms, al igual que en otros estudios *in vivo* (Furst et al. 2007). Los biofilms continuaron desarrollándose a lo largo del tiempo y el número de bacterias fue aumentando hasta alcanzar la madurez a las 72 horas de incubación en los tres casos. Se ha informado de diferencias estadísticamente significativas en la carga de bacterias entre los dientes e implantes (Furst et al. 2007), coincidente con nuestro resultado cuando comparamos el total de las bacterias del biofilm maduro en hidroxiapatita *versus* titanio o zirconio.

Se han encontrado resultados contradictorios en los efectos de las distintas superficies sobre la formación de placa bacteriana y la afinidad para la adherencia bacteriana para varios materiales, entre ellos el titanio y el zirconio. Entre los colonizadores iniciales, Rimondini y colaboradores (Rimondini et al. 2002) estudiaron *in vitro* la adherencia bacteriana al titanio y a dos tipos de superficies de zirconio e informaron que en zirconio *S. mutans* mostró significativamente mayor adherencia que en titanio a las 24 horas, mientras que

S. sanguis mostró mayor adherencia a los especímenes de titanio. No se encontraron diferencias para *Actinomyces* spp. Por otro lado, Lee y colaboradores (Lee et al. 2011), observaron que no había diferencias estadísticamente significativas en la adherencia bacteriana de *S. sanguis* entre titanio y zirconio *in vitro* tras 2 horas de incubación. Afya y colaboradores (Afya et al. 2012) observaron que *S. mitis* tenía menos afinidad para adherirse al zirconio que a la superficie de titanio después de 6 horas de incubación *in vitro*. Los estudios mencionados anteriormente se realizaron a corto plazo (24 horas o menos) y describen la colonización bacteriana temprana. En nuestro caso, usando como colonizadores iniciales *S.oralis*, *A.naeslundii* y *V.parvula*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre biofilms de titanio y zirconio de 12 ó 24 horas, lo que está de acuerdo con el trabajo de Rimondini y colaboradores (Rimondini et al. 2002) que no muestra diferencias significativas en la adhesión bacteriana de *Actinomyces* spp a las 24 horas.

Si se consideran los biofilms maduros, nuestros resultados coinciden con el trabajo de Rabelo de Oliveira y colaboradores (Rabelo de Oliveira et al. 2012), que empleando qPCR no muestran diferencias estadísticamente significativas entre el número de copias de ADN de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y bacterias totales para las dos superficies, titanio y zirconio *in vivo*. Rimondini y colaboradores (Rimondini et al. 2002) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la adhesión bacteriana de *P. gingivalis* *in vitro* a las 24 horas, como en nuestro caso. Quirynen y colaboradores (Quirynen et al. 1994) usando microscopía de contraste de fase mostraron que los materiales con baja energía libre superficial, como el zirconio, con frecuencia albergan microorganismos cocoides como en nuestro modelo de

biofilm, donde el biofilm maduro en zirconio mostró mayor cantidad de *S. oralis* que en el biofilm de titanio, aunque no hubo diferencias significativas.

El fracaso de los implantes y las enfermedades periimplantarias son problemas a los que debe enfrentarse a diario el dentista. Una proporción significativa de los implantes médicos se convierte en el foco de una infección relacionada con el dispositivo, incluyendo los implantes dentales, que resulta difícil de erradicar debido al estado de las bacterias en los biofilms bien desarrollados (Costerton et al. 2005). Está bien documentado que los biofilms en los implantes dentales juegan un papel muy importante en la génesis de la inflamación periimplantaria (Busscher et al. 2010, Lee y Wang 2010).

Sin embargo, hoy en día, no hay evidencia suficiente que permita realizar conclusiones definitivas sobre las implicaciones clínicas de los parámetros que se han descrito para determinar el éxito o el fracaso de los implantes. En esta investigación, hemos intentado estudiar la idoneidad de un modelo de biofilm *in vitro* desarrollado previamente para investigar los elementos más importantes que pueden ser de interés relacionados con la periimplantitis, empleando las propiedades de las superficies de los implantes como ejemplo de variable de estudio.

7. Conclusión

Este estudio demuestra que el modelo de biofilm *in vitro* propuesto es válido para el desarrollo de biofilms periimplantarios y permite evaluar, no sólo el recuento bacteriano, sino también el efecto de la superficie del implante en el desarrollo de biofilms.

La estructura tridimensional de los biofilms orales, desarrollados con seis especies bacterianas que incluían colonizadores iniciales (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*), en el modelo estático *in vitro* utilizado, está condicionada por la superficie utilizada. El uso combinado de microscopía CLSM y LTSEM y la técnica de qPCR demostraron su utilidad para el estudio de la distribución espacial del biofilm generado sobre cada uno de los materiales y la viabilidad de los microorganismos en el mismo.

Los resultados obtenidos por microscopía CLSM y LTSEM, demuestran que los biofilms formados sobre titanio e hidroxiapatita presentan una estructura celular compacta y con abundante presencia de EPS. En cambio, los biofilms generados sobre zirconio son de estructura más porosa y forman un biofilm principalmente de disposición laminar e inferior grosor que los generados sobre titanio e hidroxiapatita

Los resultados obtenidos por qPCR demuestran que el material más densamente colonizado es la hidroxiapatita. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el número de células bacterianas ni en la abundancia de los periodontopatógenos utilizados (*A. actinomycetemcomitans*

y *P. gingivalis*) en los biofilms generados sobre zirconio frente a los de titanio. Por tanto, ambos materiales son igualmente susceptibles de ser colonizados por bacterias orales y de permitir el desarrollo de biofilms bacterianos hasta la madurez.

8. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado a través del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), como un Proyecto de Investigación con el Ministerio de Ciencia e Innovación y la compañía Dentaïd S.A.

En primer lugar, gracias a mi tutor, David Herrera, por darme esta oportunidad.

Especial agradecimiento a todo el personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología: María del Carmen Sánchez, Arancha Llama-Palacios, María José Marín, Elena Figuera, Itziar González, Ana O'Connor y Conchita García –Patos, ya que sin su ayuda y dedicación no me habría sido posible realizar este trabajo.

Por último, quiero agradecer la ayuda y asistencia técnica de Luis M. Alonso y Alfonso Cortés del Centro de Microscopía y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid y a Fernando Pinto del Centro de Ciencias Ambientales (CSIC).

.

9. Bibliografía

1. Aas, J. A., Paster B. J., Stokes L. N, Olsen I., Dewhirst F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721–5732.
2. Afya S. D. A-R, Dymock D., Younes C., O'Sullivan D. (2012). Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *J Dent* 40: 146-153.
3. Berglundh, T., Persson, L., Klinge, B. (2002). A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol* 29: Suppl 3, 197-212
4. Binon PP, Weir DJ, Marshall SJ. (1992) Surface analysis of an original Branemark implant and three related clones. *Int J Oral Maxillofac Implants* 7: 168-175.
5. Buergers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, et al. (2010) In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2: 156–164
6. Busscher H.J, Rinastiti M., Siswomihardjo W., Van der Mei H.C (2010) Biofilm Formation on Dental Restorative and Implant Materials. *J Dent Res* 89 (7):657-665,
7. Costerton JW, Montanaro L, Arciola CR. (2005) Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *Int J Artif Organs* 28:1062-1068.

8. Diaz, P. I., Chalmers N. I., Rickard A. H., Kong C., Milburn C. L, Palmer Jr. R. J., Kolenbrander P. E. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2837–2848.
9. Do Nascimento C, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF, Ribeiro RF. (2013). Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 1–7 doi: 10.1111/clr.12093.
10. Donlan R. M., Costerton J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* April vol. 15 nº 2: 167- 193.
11. Ericsson, I., Berglundh, T., Marinello, C., Liljenberg, B., Lindhe, J. (1992) Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 3: 99-103
12. Furst MM, Salvi GE, Lang NP, et al. (2007). Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 18:501-508.
13. Jansen VK, Conrads G, Richter EJ. (1997) Microbial leakage and marginal fit of the implant abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12: 527-540.
14. Kohal R-J, Finke H.C., Klaus G. (2009). Stability of Prototype Two-Piece Zirconia and Titanium implants after Artificial Aging an in Vitro Pilot Study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, Vol. 11, N. 4. 323-329

15. Kolenbrander, P. E., Andersen R. N., Blehert D. S., Eglund P. G., Foster J. S, Palmer Jr. R. J. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:486–505.
16. Kolenbrander, P. E., Andersen R. N., Moore L. V. H. (1990). Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Appl Environ Microbiol* 56:3890–3894
17. Kolenbrander, P. E., y London J. (1993). Adhere today, here tomorrow oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 175:3247–3252.
18. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. (2012) Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol*. May; 39(5): 425–433.
19. Lang, N.P. y Berglundh, T. (2011). Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 38 Suppl 11: 178-181
20. Lee A. y Wang H-L. (2010). Biofilm Related to Dental Implants. *Implant Dentistry*; volume 19, number 5
21. Lee B-C., Jung G-Y, Kim D-J, Han J-S. (2011). Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. *J Adv Prosthodont*; 3:81-4.
22. Leonhardt, A., Berglundh, T., Ericsson, I., Dahlen, G. (1992) Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 3: 112-119

23. Lindhe, J. y Meyle, J. (2008). Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 35: 282-285
24. Lindhe, J., Berglundh, T., Ericsson, I., Liljenberg, B., Marinello, C. (1992) Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin Oral Implants Res* 3: 9-16
25. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. (1988) Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10-year follow-up study. *J Dent Res* 76: 1667-1674.
26. Listgarten M. y Lai CH. (1999). Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol* 70: 431–437
27. Marsh PD. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32(Suppl.6): 7-15.
28. Mombelli A, Feloutzis A, Brägger U, Lang NP. (2001) Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline: clinical, microbiological and radiological results. *Clin Oral Implants Res* 12: 287–294.
29. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E Jr, et al. (1987). The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 2: 145-151.
30. Mombelli A. y Décaillot F. (2011). The characteristics of biofilms in peri-implant disease. *J Clin Periodontol* 38 (Suppl. 11): 203- 213
31. Nyvad, B., y M. Kilian. (1987). Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand. J Dent Res* 95:369–380.

32. Papaioannou W, Quirynen M, van Steenberghe D. (1996). The influence of periodontitis on the subgingival flora around implants in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 7: 405–409.
33. Quirynen M, De Soete, van Steenberghe D. (2002) Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res* 12: 1–19
34. Quirynen M, Papaioannou W, van Steenberghe TJM. (1996). Intraoral transmission and the colonization of oral hard surfaces. *J Periodontol* 67: 986-993.
35. Quirynen M, Van der Mei HC, Bollen CM, Van den Bossche LH, Doornbusch GI, van Steenberghe D, et al. (1994). The influence of surface-free energy on supra- and subgingival plaque microbiology. An in vivo study on implants. *J Periodontol* 65: 162-7.
36. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, et al. 2006. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res* 17: 25-37.
37. Quirynen M. y Bollen, C.M. (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 22: 1-14
38. Rabelo de Oliveira G, Pozzer L., Cavaliere-Pereira L., Hemerson de Moraes P., Olate S., Albergaríá Barbosa J. R. (2012) Bacterial adhesion and colonization differences between zirconia and titanium implant abutments: an in vivo human study. *J Periodontal Implant Sci*; 42: 217-223.

39. Renvert S., Polyzois I., Claffey N. (2011). How do implant surface characteristics influence peri-implant disease? *J Clin Periodontol* 38 (Suppl.11): 214- 222.
40. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. (2002) Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. *Int. J Oral Maxillofac Implants* 17: 793-8.
41. Sánchez M.C., Llama-Palacios A., Blanc V., León R., Herrera D., Sanz M. (2011). Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodont Res* 46: 252-260
42. Scarano A., Piatelli M., Caputi S., Favero G.A., Piatelli A. (2004). Bacterial adhesion on commercially pure titanium and zirconium oxide disks: an in vivo human study. *J. Periodontol.* Vol. 75. N. 2. 292-296.
43. Sedlacek M.J. y Walker C. (2007). Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol* 22(5): 333-339
44. Sheiham A. y Netuveli G.S. (2002). Periodontal disease in Europe. *Periodontol* 2000 29: 104- 121.
45. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, et al. (2008) Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* 19:975-982.
46. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent Jr. RL. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25: 134-144.
47. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187- 209.

48. Tabanella G, Nowzari H, Slots J. (2009). Clinical and microbiological determinants of failing dental implants. Clin Implant Dent Relat Res 11:24-36.
49. Wennerberg A. y Albrektsson T. (2010). On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. Int J Oral Maxillofac Implants 25: 63-74
50. Yoshinari M., Oda Y., Kato T., Okuda K. (2001) Influence of surface modifications to titanium on antibacterial activity in vitro. Biomaterials 22: 2043-2048
51. Zitzmann, N.U. y Berglundh, T. (2008). Definition and prevalence of peri-implant diseases. J Clin Periodontol 35: 286-291.